

**VERSUCHE ZUR ÜBERPRÜFUNG DER IMMUNITÄT
GEGEN ORTHOPOCKENVIREN IM MÄUSEMODELL**

OTTO HORNSTEIN

~~1987~~

Disbui. München
1988



Digitized by the Internet Archive
in 2026

Aus dem Institut für Medizinische Mikrobiologie,
Infektions- und Seuchenmedizin
der Tierärztlichen Fakultät der Universität München
Vorstand: Prof. Dr. Dr. h.c. mult. A. Mayr
Arbeit angefertigt unter der Leitung von:
Prof. Dr. H. Mahnel

**Versuche zur Überprüfung der Immunität gegen
Orthopockenviren im Mäusemodell**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der tiermedizinischen Doktorwürde
der Tierärztlichen Fakultät der
Ludwig - Maximilians - Universität
München

von
Otto Hornstein
aus
Ostrach

München 1987

Gedruckt mit Genehmigung der Tierärztlichen Fakultät
der Universität München

Dekan: _____ Prof. Dr. M. Rüsse

Referent: _____ Prof. Dr. H. Mahnel

Korreferent: _____ Prof. Dr. E. Munz

Tag der Promotion: _____ 26. Februar 1988

1.	Einleitung.....	1
2.	Schrifttum.....	2
2.1	Taxonomie des Vacciniavirus.....	2
2.2	Antigene von Orthopoxviren.....	3
2.3	Immunogene Determinanten.....	6
2.4	Stämme des Vacciniavirus.....	7
2.5	Biologisches Verhalten verschiedener VaV-Stämme.....	9
2.6	Die Vacciniavirusinfektion beim Versuchstier.....	10
2.7	Virusvermehrung in Zellkulturen.....	14
2.8	Extra- und intrazelluläres Virus.....	15
2.9	Paramunität und Immunität gegen OPV, Ausbildung, zeitl. Verlauf und beteiligte Systeme.....	16
2.10	Aktive Immunisierung.....	22
2.11	Passive Immunisierung.....	25
2.12	Nachweis einer Immunität.....	27
3.	Eigene Untersuchungen	
3.1	Material und Methoden.....	33
3.1.1	Abkürzungen.....	33
3.1.2	Zellkulturen.....	34
3.1.3	Virusstämme.....	34
3.1.4	Versuchstiere.....	35
3.1.5	Titrierung der Infektiosität.....	35
3.1.6	Virusvermehrung und Virusreinigung.....	36
3.1.7	Vermehrungskurve von intra- und extra- zellulärem Virus.....	38
3.1.8	Infektionstechnik und Blutentnahme an der Maus.....	38
3.1.9	ELISA.....	40
3.1.10	Serumneutralisationstest (PRT mit VaV).....	41
3.1.11	Hämagglutinationshemmungsreaktion mit VaV.....	43
3.1.12	Technik der monoklonalen Antikörper.....	43

3.2	Versuche und Ergebnisse.....	46
3.2.1	Vorversuche.....	46
	a) Auswahl der optimal empfänglichen Zell-	
	kulturen für den Virusnachweis.....	46
	b) Vermehrung des VaV-M1 in MA-Kulturen.....	48
3.2.2	Ermittlung der Mindestdosis für die Manifesta-.....	50
	tion der VaV-Infektion in der Maus	
	a) intraperitoneale Infektion (verschiedene	
	Neurovacciniastämme, verschiedene Häusestämme).....	50
	b) subkutane Infektion.....	55
	c) intrakutane Infektion.....	56
3.2.3	Pathogenese der VaV-Modellinfektion unter	
	definierten Bedingungen.....	58
	a) Intrakutane Infektion.....	58
	b) Intraperitoneale Infektion.....	59
3.2.4	Prüfung des Infektionsmodelles.....	60
3.2.5	Herstellung und Prüfung monoklonaler Antikörper.....	67
	a) Herstellung monoklonaler Antikörper.....	67
	b) Charakterisierung der MAK.....	68
3.2.6	Schutzteste mit MAK.....	75
4.	Besprechung der Ergebnisse.....	78
5.	Zusammenfassung.....	88
6.	Summary.....	90
7.	Literaturverzeichnis.....	92

1. Einleitung :

Das Vacciniavirus, bekannt als historisches Impfvirus gegen die Menschenpocken, ist der Prototyp für das Genus ORTHO-POXVIRUS (OPV) der Familie der Pockenviren. Innerhalb dieses Genus bestehen enge immunologische Verwandtschaften zwischen allen Virusspezies und -stämmen. Die Immunisierung mit einem dieser Viren schützt gegen Infektionen mit allen anderen Viren dieses Genus.

Zur Schutzimpfung (gegen humane und animale OPV-Infektionen) hat man weltweit nur das Vacciniavirus in Form vermehrungsfähiger, ausgewählt milder, neuerdings auch attenuierter Stämme herangezogen. Mit Impfstoffen aus inaktivierten Pockenviren ist es bisher nie gelungen, eine nennenswerte Immunität zu erzielen.

Ein neuer Weg der aktiven Immunisierung wird seit kurzem bei verschiedenen Virusarten über die Applikation von Anti-idiotyp-Antikörpern (AIAK) gesucht. Letztere sind hochspezifische Immunglobuline, deren variable Regionen (Epitope) gegen die von neutralisierenden MAK eines Virus gerichtet sind, im Idealfall also in der Konfiguration den spezifischen immunisierenden Epitopen des Virus weitgehend gleichen. AIAK-Vakzinen haben bei bestimmten Virusarten bereits vielversprechende immunisierende Wirkung gezeigt. Im Rahmen eines Forschungsvorhabens, das mit dem Vacciniavirus als Modell die Entwicklung von Antiidiotyp-Antikörpern zum Ziel hat, galt es, ein Verfahren zu erarbeiten, mit dessen Hilfe an der Maus Anti-Vaccinia-Immunitäten komplexer Art und verschiedenen Grades nicht nur serologisch, sondern insbesondere auch mittels Belastungsinfektion geprüft werden können. Die Entwicklung einer geeigneten Mäuse-Modellinfektion und die Erprobung ihrer Eignung war Gegenstand der vorliegenden Arbeit.

2. Schrifttum

2.1. Taxonomie des Vacciniavirus

Seinen Namen erhielt das Vacciniavirus (VaV) vom lateinischen 'vacca'=Kuh, nachdem es Jenner 1796 wahrscheinlich aus Kuhpocken isolierte und mit ihm gegen Menschenpocken impfte. Seither wurde es ununterbrochen als Impfvirus (=Vakzine) im Labor, am Tier oder in Kulturen weitergezüchtet. Seine echte Abstammung bleibt unklar (BAXBY et al., 1986).

Es gehört mit den Menschen-, Kuh-, Büffel-, Affen-, Kaninchen-, Kamel-, Elefanten- und Mäusepockenviren zum Genus Orthopoxvirus der Familie Poxviridae (MATTHEWS, 1982). Alle Spezies und Stämme des Genus sind immunologisch-serologisch eng verwandt.

Die Orthopockenviren (OPV) gehören zu den größten Tierviren und sind komplex aufgebaut. Ihre Viriongrösse wird mit 270x218nm (MOSS, 1974), bzw. 300x240nm (NAGINGTON und HORNE, 1962), bzw. 350x200nm (ROLLE und MAYR, 1978) angegeben und kann je nach Art der Präparation leicht variieren.

Die quaderförmigen Partikel besitzen einen bikonkaven Innenkörper, Core oder Nukleoid genannt, der das Genom enthält. Er wird von einer zweischichtigen Lipoproteinmembran umhüllt. Die innere Schicht dieser Membran hat eine dichte radiäre Struktur, aus der Projektionen in die äußere Schicht ragen.

Den Konkavitäten des Cores außen angelagert sind zwei Lateralkörper, die aus Proteinen bestehen. Die Begrenzung des Virus stellt eine äußere dichte Doppelmembran dar, deren innere Schicht aus von Lipiden umgebenen Proteinen

besteht, und deren äußere Schicht aus Proteolipiden aufgebaut ist (ROLLE und MAYR, 1978; MOSS, 1974).

In diese äußere Schicht sind tubulär aufgebaute Proteinfilamente von 6-8 nm Durchmesser unregelmäßig eingelagert (NAGINGTON und HORNE, 1962; MOSS, 1974).

Die OPV enthalten über 100 Polypeptide, davon mindestens neun in der äußeren Hülle (RODRIGUEZ et al., 1985). Diese Struktur-Polypeptide, an und direkt unter der Oberfläche des Virus lokalisiert, können bei verschiedenen OPV variieren und werden zur Differenzierung der Stämme herangezogen.

Die Cores verschiedener Virusstämme ergeben dagegen im SDS-PAGE alle dasselbe Polypeptidmuster und werden als OPV-spezifisch gewertet (TURNER und BAXBY, 1979).

2.2. Antigene von Orthopoxviren

Immunseren enthalten ein breites Spektrum von Antikörpern, die gegen eine Vielzahl von antigenen Determinanten der OPV gerichtet sind. Diese Antikörper erkennen und reagieren mit

1. löslichen Antigenen,
2. virusinduzierten Zellmembranantigenen und
3. antigenen Strukturen an der Oberfläche und im Inneren des Virus.

KITAMOTO et al. (1984) teilten diese Antigene aufgrund ihrer unterschiedlichen Präferenz (Immunodominanz) in Hauptantigene und Nebenantigene und unterscheiden bei den ersteren zwischen virusinduzierten Zellmembran-assoziierten Antigenen (CSA), dem Nucleoprotein-Antigen (NP), hitzelabilem und -stabilem Komplex-Antigen (LS), Hämagglutinin (HA) und Antigen der Einschlußkörperchen vom Typ A, welches nur bei Kuh-, Mäusepockenvirus und VaV isoliert werden kann, obwohl VaV keine solche Einschüsse induziert (KITAMOTO et al., 1986 a und b).

Lösliche Antigene können, unabhängig vom Virion, extrazellulär nachgewiesen werden. Man nimmt an, daß ein Teil von ihnen virusspezifische Proteine sind, die zwar zur Virusvermehrung benötigt, nicht aber in das Virion eingebaut werden (HERRLICH, 1967). Der andere Teil stellt Antigenmaterial dar, das in infizierten Zellen im Überschuß gebildet wird. Neben in Virionen nicht nachweisbaren Proteinen konnten das Hämagglutinin, das NP-Antigen, LS-Antigene und Antigene, die mit in der Zytoplasmamembran infizierter Zellen lokalisierten virusspezifischen Proteinen übereinstimmten, nachgewiesen werden. Viruszellextrakte von VaV zeigten im Agargelddiffusionstest gegen Anti-VaV-Immunsérum 17 Präzipitationslinien (WESTWOOD et al., 1965). Fünf der gebundenen Komponenten waren hitzelabil und sechs hitzestabil (L- resp. S-Antigene). IKUTA et al. (1979) konnten in Zellkulturüberständen von mit Kuhpockenvirus und VaV infizierten RK₁₃-Zellen 5 LS-Antigene nachweisen, von denen drei früh, mit niederem Molekulargewicht, und zwei spät synthetisierte Proteine, mit hohem Molekulargewicht, sind.

Virusinduzierte Zellmembran-assoziierte Antigene werden nach ihrer Herkunft aufgeteilt in (1) Bestandteile der Virushülle, die bei der Virus-Zellfusion in die Zellmembran eingebaut und teilweise durch Proteasen verändert, und (2) virusinduzierte Proteine, die vom Zellinnern in die Zellmembran transferiert werden. Von (2) wurden ein frühes Protein mit einem MG von 40 bzw 43 KD, das von VaV bzw. Kuhpockenvirus induziert wird, vier frühe Proteine mit nicht bekanntem MG, 1 Protein mit 32-34 KD, das sowohl früh als auch spät, und 6 Proteine mit nicht bekannten MG, die spät synthetisiert werden, identifiziert (Literatur bei KERN, 1987).

Virusgebundene Antigene umfassen das breite Spektrum von antigen wirksamen Proteinen und Glykoproteinen, die auf der Hülle, im Core und im Nukleoprotein des Virions lokalisiert sind.

WILTON et al. (1986) konnten zeigen, daß vom Immunsystem oberflächlich und innen liegende Strukturproteine des intakten Virions erkannt werden. Daneben spielen auch die bei der Virusreifung auftretenden Polypeptide als Antigene eine Rolle, bspw. wirkt das 94 KD-Protein, das eine Vorstufe des 62 KD-Proteins ist, als Antigen.

Eines der am besten untersuchten viralen Antigene ist das Hämagglutinin, von dem angenommen wird, daß es aus einem Phospholipoproteinkomplex besteht. Dabei adsorbiert das Phospholipid Hühnererythrozyten, während das Protein die antigene Determinante darstellt. Verschiedene Autoren konnten die hämagglutinierende Komponente isolieren und ermittelten im SDS-PAGE oder im Western-Immunoblotting-verfahren ihr Molekulargewicht. In den Ergebnissen variierten Anzahl und Molekulargewicht der festgestellten Strukturproteine von 3 mit 150, 34 und 10 KD, über 2 mit 41 und 85 KD zu einem mit 85 KD bzw. 89 KD.

WILTON et al. (1986) untersuchten im Western-Immunoblot VaV gegen polyklonale Seren und monoklonale Antikörper (MAK) und konnten folgende Proteine nachweisen, gegen welche Serumaktivität festzustellen war:

Hauptantigene:

35 KD	lokalisiert in der Hülle
28 KD, 62 KD	lokalisiert im Core

Nebenantigene:

40, 42, 55 und 98 KD	lokalisiert in der Hülle
60, 94 KD	lokalisiert im Core

Andere Autoren isolierten weitere Oberflächenproteine und wiesen ihr Molekulargewicht im Immunoblot nach:

58 KD	Oberflächentubulusprotein
11 KD	basisch. Hüllphosphoprotein
14 und 28 KD	Hüllproteine
60 und 100 KD	LS-Antigene

Zusätzlich im Inneren des Virions nachgewiesene Antigene sind: Nucleoprotein mit 65 KD, das die gesamte DNA und einen großen Anteil des Virusproteins trägt und das für das

einen großen Anteil des Virusproteins trägt und das für das Genus OPV gruppenspezifisch ist.

Virus-occluding factor	54 oder 56 KD
Poly-A-Polymerase	35,50 KD
RNA-Polymerase	34,137 KD

(Lit. bei KERN, 1987).

2.3. Immunogene Determinanten

Lösliche Antigene aus VaV-infizierten Zellen bewirkten in Kaninchen eine Immunität gegen das VaV. Sie enthalten somit eine immunogene Komponente, die aber nicht identifiziert wurde.

Zelloberflächenantigene stellen den Angriffspunkt der Zytotoxizität dar, spielen also eine wesentliche Rolle bei der zellulären und der humoralen Abwehr. Auch hier konnten aber, mit Ausnahme des HA, die verantwortlichen Antigene nicht identifiziert werden.

Bessere Informationen liegen über die virusgebundenen Antigene vor (MORRISON et al., 1985). So konnte durch die Applikation von isoliertem Oberflächentubulusprotein mit 58 KD bei Kaninchen die Produktion von neutralisierenden Antikörpern (AK) induziert werden. Diskutiert wird ein Einfluß der Anti-58-KD-Immunseren auf die Adsorption und Penetration der Viruspartikel.

Denselben Neutralisationsmechanismus vermutet man für AK gegen ein 37-KD-Hüll-Glykoprotein. Unklar ist dagegen der Neutralisationsmechanismus eines Immunserums gegen ein basisches Hüllphosphoprotein mit 11 KD, das VaV im Plaque-reduktionstest (PRT) hemmte. Die von RODRIGUEZ et al. (1985) beschriebenen neutralisierenden MAK gegen VaV reagierten sehr stark mit einem 14 KD-Hüllprotein und schwächer mit 11 und 28 KD-Proteinen. Nach der enzymatischen Aufspaltung des 14 KD-Proteins mit Protease V-8 wurden 2 unterschiedliche Fragmente des Proteins von den

MAK erkannt, woraus die Autoren eine Bindung der 3 unterschiedlichen MAK an mindestens 2 verschiedene Epitope des Proteins folgerten.

RODRIGUEZ et al. konnten keine Veränderung in der Adsorption und Penetration neutralisierter VaV-Viruspartikel feststellen, dagegen bei 1 MAK eine ausgeprägte Blockierung des Uncoatings nachweisen (Literatur bei KERN, 1987).

2.4. Stämme des Vacciniavirus

Das VaV besitzt das breiteste Wirtsspektrum der Pockenviren und vermehrt sich in den verschiedensten Arten von Zellkulturen. Es läßt sich leicht an verschiedene Wirtssysteme adaptieren. Durch selektive und mutagene Vorgänge entstand im Laufe der Jahrzehnte eine Spezialisierung von vielen Stämmen, die sich in ihren biologischen Eigenschaften unterscheiden. Dermo-, Neuro- oder Hodenvacciniavirus erhielten diese Namen nach der Adaptierungs- bzw. Vermehrungsvorgeschichte von Impfstoffstämmen. Auch die Wirtsspezies prägte Bezeichnungen wie Lapine-, Ei- oder Kulturvakzine (HERRLICH, 1967). Diese Bezeichnungen sagen über den Charakter eines Stammes nichts aus.

Für eine Differenzierung von VaV-Stämmen sind folgende verschiedenen biologischen Marker wichtig (MAYR et al., 1975):

1. Verhalten im Hühnerembryo (Beimpfung der CAM-Membran, Allantoishöhle oder des Dottersackes) in bezug auf LD₅₀, Generalisierung, Pockenmorphologie und anderes;
2. Verhalten in verschiedenen Zellkulturarten;
3. Verhalten in verschiedenen Versuchstieren, v.a. infantile und erwachsene Maus, Kaninchen u.a.; in bezug auf ID₅₀, LD₅₀, Organspezifität, Generalisierungstendenz nach verschiedenen Infizierungsmodi;
4. HA-Bildung;
5. Immunisierende Potenz u.a..

Die folgende Beschreibung einzelner Stämme beschränkt sich vor allem auf die Kriterien 3 der Differenzierung, z.T. sind 4 und 5 mit einbezogen. Dabei ist allerdings zu beachten, daß die von einzelnen Autoren genannten Parameter entscheidend vom Applikationsmodus und vom verwendeten Tiermaterial abhängen.

Beim Vergleich der beiden VaV-Stämme IHD-E und Levaditi an verschiedenen ingezüchteten Mäusestämmen kam BRIODY (1959) zu folgenden Ergebnissen:

Es gibt sehr große Unterschiede in der Empfänglichkeit. Von den untersuchten Mäusestämmen sind DBA, C₃H und A stark empfänglich, C₅₇BL₆ mittel und die anderen Stämme wenig empfänglich. Bei der intradermalen (i.d.) Applikation des VaV-Stammes Levaditi bzw. von IHD-E schwankte die Infektionsdosis, die zur Induktion von Hautläsionen nötig war, zwischen weniger als 10³ Plaquebildenden Einheiten (PFU) für C₅₇BL₆ Mäuse und 10^{4,8} bzw. 10^{4,5} PFU für BDF₁ Mäuse. Noch größer waren die Schwankungen zwischen den Dosen, die zur Induktion von Antikörpern benötigt wurden.

Die verschiedenen Applikationsarten des infektiösen Materials beeinflussen ebenfalls die Ergebnisse. AMIES (1962) gab gleiche Dosen des VaV-Stammes Lister zur Immunisierung von Kaninchen subkutan (s.c.) und intrakutan (i.k.) an und konnte bei etwa 50% der s.c. immunisierten gegenüber 75% der i.k. immunisierten Kaninchen eine folgende Immunität nachweisen. BRIODY (1959) benötigte bei der intradermalen (i.d.) Applikation bis zu 100fach höhere Dosen zur Induktion einer Antikörperantwort als bei der intranasalen (i.n.). Außerdem waren nach der i.n. Applikation höhere Antikörpertiter nachzuweisen als nach der i.d. Verabreichung. Bei der i.p. Applikation des VaV-Stammes M1 war die etwa 50000fache Dosis gegenüber der intracerebralen (i.cer.) Applikation als Äquivalent für eine 50% letale Dosis (LD₅₀) nötig. HOCHSTEIN-MINTZEL et al. (1975) beschrieben nach intravenöser (i.v.) Verabreichung von 10⁷ PFU des VaV-Stammes Elstree Krankheits-

erscheinungen bei Kaninchen, während die intramuskuläre (i.m.) Gabe von 10^8 PFU reaktionslos verlief.

2.5. Biologisches Verhalten verschiedener VaV-Stämme

Die VaV-Stämme IHD (International Health Division) wurden häufig in Mäusegehirnen vermehrt. Entsprechend der anschließenden Passagen in anderen Systemen werden sie mit zusätzlichen Abkürzungen gekennzeichnet. Die Stämme IHD-T und IHD-TE sind HA-negativ (im Hühnerei passagiert) und wurden deshalb als Impfstämme gegen Mäusepocken empfohlen, die anderen beschriebenen Stämme sind HA-positiv.

Verhalten in der Maus: (7 verschiedene Mäusestämme):

Stamm IHD-TE:

ID ₅₀ (Maus)	i.d.	
(Hautläsionen bei 50% der inf.Tiere)		$10^3 - 10^{4,5}$ PFU
ID ₅₀ (50% AK-Bildung)	i.d.	$10^{3,2} - 10^{4,6}$ PFU
	i.n.	$10^{2,9} - 10^{4,9}$ PFU

Stamm IHD:

LD ₅₀	i.n.	$10^{1,7}$ KID ₅₀
	i.cer.	$10^{0,3}$ PFU

Bei der i.p. Applikation von 10^8 PFU waren keine Krankheitserscheinungen zu beobachten. Die Stämme sind gut immunogen wirksam und induzieren eine gute AK-Antwort, wobei allerdings mit der Zunahme der Passagenanzahl im Ei oder auf Zellkulturen die Virulenz für das Versuchstier abfällt (BRIODY, 1959; LINK et al., 1965).

Der VaV-Stamm WR Elstree wurde auf 6 Wochen alten CLFP Mäusen untersucht (HUTT, 1975a):

ID ₅₀	i.d. (Hautläsionen bei 50% der Tiere)	$10^{1,3}$ KID ₅₀
LD ₅₀	i.cer.	10^1 KID ₅₀
	i.n.	$10^{3,7}$ KID ₅₀

Der VaV-Stamm Bern (HA+) wurde von HOCHSTEIN-MINTZEL et al. (1967) an NMRI-Säuglingsmäusen getestet. Die ID₅₀ bei i.p. Applikation betrug je nach Lebensalter zwischen 10¹ und 10⁵ KID₅₀.

Den VaV-Stamm MVA, in Deutschland zur Pockenschutzvorimpfung beim Menschen eingesetzt, haben MAYR et al. (1975) genau klassifiziert. Das auf den Dermovacciniastamm CVA zurückgehende Virus wurde über mehr als 570 HEF-Passagen geführt und hat seine Virulenz für das Kaninchen und die Maus vollständig verloren. Zur Erzeugung einer Immunität sind mehrmalige Impfungen mit hohen Dosen nötig.

Der VaV-Stamm Levaditi ist schwach neurovirulent und wurde auf verschiedenen Mäusestämmen untersucht:

ID ₅₀ i.d. (Hautläsionen bei 50% der Tiere)	10 ³	-10 ^{4,8}	PFU
ID ₅₀ (Antikörperbildung i.n. bei 50% der Tiere)	10 ^{3,9}	-10 ^{6,2}	PFU
	i.d.	10 ^{4,4}	-10 ⁶ PFU

Bei der i.p. Applikation von 10⁸ PFU waren keine Krankheiterscheinungen zu beobachten. Der Stamm ist nur schwach immunogen wirksam. Die HA-hemmenden AK-Titer waren sehr niedrig (BRIODY, 1959).

Der VaV-Stamm M1 ist HA-positiv und gut immunogen wirksam. Er verhielt sich an NMRI-Mäusen wie folgt (MAYR et al., 1978):

LD ₅₀ i.cer.	1	KID ₅₀
LD ₅₀ i.p.	10 ^{4,75}	KID ₅₀
ID ₅₀ i.p.	10 ^{4,5}	KID ₅₀

2.6. Die Vacciniavirusinfektion beim Versuchstier

Von dem vielfach als Impfvirus eingesetzten VaV ist ein sehr breites Spektrum empfindlicher Tiere bekannt. Ungeklärt blieb aber, ob Tiere ein natürliches Reservoir für

das VaV bilden und welche Rolle es als Krankheitserreger einnimmt (BAXBY et al., 1986). Die weitaus meisten Kenntnisse über den Verlauf tierischer Erkrankungen durch das VaV vermittelten künstliche Infektionen.

Nach i.p. Applikation von verschiedenen Neuro-, Dermo-, und Zellkultur-VaV-Stämmen an 3-5 Tage alte Babymäuse charakterisierte MAYR (1957) die Infektion folgendermaßen:

Die Impferkrankung ist eine zyklisch verlaufende Infektionskrankheit. Das Virus kann sich nicht nur in der Haut, sondern auch in zahlreichen inneren Organen vermehren und dort Schädigungen hervorrufen. Primär affine Organe sind Leber und Knochenmark. Nach der Inkubationszeit von 2-5 Tagen kommt es über die Virämie zur Ausschwemmung und Verbreitung des Virus im gesamten Körper. Sekundär affine Organe werden betroffen, die ersten allgemeinen Krankheits-symptome treten auf.

Eine sehr wichtige pathogene Komponente stellt die vom VaV gesetzte gefäßschädigende Wirkung dar. Die Applikation von hohen Dosen führt zu Gefäßwandschädigungen und gestörter Blutzirkulation vor allem in der terminalen Strombahn. Das pathologische Bild gleicht dem einer hämorrhagischen Septikämie mit Blutungen in der Niere, im Darm und in anderen Organen. Der Virusnachweis gelingt in allen Organen. Nach der Applikation von mittleren Dosen lassen sich vor allem Erythro- und Serodiapedese, Ascites und Lungenveränderungen in Form von katarrhalischen Herdpneumonien finden.

Bei der mehr verzögerten Erkrankung ist vor allem der typische Pockenausschlag an der Haut zu sehen. Es treten kleine erhabene, gut von der Umgebung abgesetzte Knötchen auf, die bevorzugt an Schwanz, Unterbauch, Extremitäten und Kopf lokalisiert sind und nur vereinzelt Nabelbildung zeigen.

Die Mortalität ist zwischen dem 3. und dem 10. Tag p.i. am höchsten. Überlebten die Tiere die ersten 7-9 Tage kam es meist zum Ausbruch von Hautpocken. Als weitere pathogene

Komponente ist die Allergisierungsfähigkeit des VaV anzusehen, die vor allem bei Mehrfachinfektionen zu Hypersensibilitätsreaktionen führen kann (HOCHSTEIN-MINTZEL et al., 1967).

Während bei Babymäusen die Infektionskrankheit weitgehend uniform verlief, zeigten die Ergebnisse einer Verlaufskontrolle bei einem Impfprogramm adulter Mäuse mit dem Stamm IHD-T gegen Mäusepocken, daß die Applikationsart und der Genotyp der geimpften Mäuse sehr unterschiedliche Reaktionen provozieren können (DIXON et al., 1982).

Weitere Unterschiede sind bedingt durch das verschiedenartige biologische Verhalten verschiedener VaV-Stämme. So ist bekannt, daß das VaV leicht seine Affinität zu bestimmten Geweben verändert und deshalb Virulenz und pathogene Eigenschaften auch von der Art der Gewebe-Passagen abhängen (SOEKAWA et al., 1974). Die folgenden Beschreibungen sind aus diesen Gründen nicht mehr allgemein gültig, sondern nur für einzelne Versuchstiergruppen zutreffend. VaV-Stamm WR, i.v. an CLFP-Mäuse verabreicht, führte zur ausgeprägten Pockenbildung am Schwanz. 5 Tage nach der Infektion zeigten sich rote erhabene Bezirke, die an Größe zunahmen und selten ein weißes Zentrum zeigten. 8 Tage p.i. bildete sich an diesen Stellen Schorf, der innerhalb der folgenden 10 Tage abfiel (HUTT, 1975a). Nach der i.d. Applikation von VaV-Stamm IHD-T an Balb-C AnN Mäuse bildeten sich am 3.Tag lokale Erytheme aus, die über eine Schwellung und Induration zu Bläschen reiften. Es folgte eine Ulceration der Epidermis (6-9 Tage nach der Infektion) und Übergang in Schorfe, die etwa nach 20 Tagen abfielen. Zurück blieben die abgeheilten Hautläsionen, die sich als leicht erhabene, haarlose Stellen abzeichneten. Histologisch zeigten sich am 5. Tag p.i. Nekrosen von Haarfollikeln und Schweißdrüsen, Nekrose der Epidermis und eine herdförmige dermale Vasculitis. Am 8. Tag p.i. waren Ulcera in der Epidermis sichtbar. Mononukleäre Zellen beherrschten das Bild. Ab dem 10. Tag fand die Reepithelialisierung

statt. Es war immer eine systemische Verbreitung und Vermehrung des Virus festzustellen. Allgemeinerscheinungen wurden nicht beobachtet (JACOBY et al., 1983).

Die intranasale Applikation von IHD-T führte neben den beschriebenen Allgemeinerscheinungen bei verschiedenen Mäusestämmen v.a. zu Pneumonien mit deutlich ausgeprägten, makroskopisch sichtbaren Verdichtungen des Lungengewebes, die zu einer starken Atemnot und zum Tod der Tiere führte (LINK et al., 1965).

Beim Kaninchen verläuft die Erkrankung etwas rascher. Nach einer Schnitimpfung mit Inokulation von VaV-Stammlymphe beginnt am 4. Tag die spezifische Rötung. Einen Tag später erscheint ein stark ausgeprägtes Papelstadium und über ein sehr kurzes Bläschenstadium bilden sich am 6.-7. Tag die Hautpusteln aus. Der ausgeprägte Pockennabel trocknet bereits am 7.Tag an, die Ausbildung der Area erreicht ihren Höhepunkt. Der Schorf fällt etwa ab dem 20. Tag ab (MAHNEL, 1960).

Die Impfung mit dem MVA-Stamm führt beim Menschen zu einer lokalen Reaktion, die im Verlaufe mehrerer Tage über die Papel- und Vesikelbildung zur Ausbildung von Pusteln führt und die relativ oft von allgemeinen Reaktionen begleitet ist. Dabei sind häufig Fieber, Mattigkeit, Kopfschmerzen und andere Symptome zu beobachten (STICKL et al., 1974). Als zusätzliches Manifestationsorgan einiger VaV-Stämme, der sog. Neurovaccinia-Stämme, ist das ZNS bekannt. Große Probleme bereitete dieses biologische Verhalten einzelner Impfstämme bei der Schutzimpfung des Menschen, wenn es im Verlauf von Impfkomplicationen neben Vaccinia necrosum, Ekzema vaccinatum und generalisierten Vacciniaerkrankungen auch zu Encephalitiden, Encephalopathien und Demyelinisierungen bzw. Neuropathien mit starken Konvulsionen und z.T. Tod im Koma kam (LANE et al., 1969; STICKL et al., 1974).

Hier folgen der Ansiedlung und Vermehrung des Virus in den Meningen entzündliche Reaktionen und eine Virusverbreitung

über das gesamte ZNS. Nicht klar ist dabei, ob das Auftreten von infektiösem VaV und die nachfolgende Entzündung im ZNS entscheidend für den tödlichen Ausgang ist, oder ob die Neurovirulenz (=genetischer Marker, der die Vermehrung und die damit zusammenhängenden histopathologischen Veränderungen kennzeichnet; SOEKAWA et al., 1974) nur einen Indikator für einen letalen Marker darstellt.

2.7. Virusvermehrung in Zellkulturen

Zur Vermehrung von Orthopockenviren werden v.a. Zellkulturen, weniger Versuchstiere oder das Brutei verwendet. Eine Einschnittvermehrungskurve kann bei Einsatz hoher Inokulumdosen, also unter der Bedingung der gleichzeitigen Infektion aller bzw. fast aller Zellen, beobachtet werden. MOSS (1974) beschreibt die Vermehrungskurve unter diesen Bedingungen. Innerhalb von 15 Minuten erfolgte die Adsorption von über 50 % des Saatvirus an die Zellen. Die aufgenommenen Viruspartikel werden in Vesikel eingeschlossen. 20 Minuten später löst sich die Vesikelmembran und die äußere Hülle des Viruspartikels auf, das Core, ohne Lateralkörper, geht in die Zytoplasmamatrix über, frühe RNA, die frühe Enzyme translatiert, wird frei. Durch Ruptur des Cores wird zwischen 30 Minuten bis 2 Stunden p.i. das Virusgenom freigesetzt. Die Eklipse (Verschwinden von infektiösem Virus) ist nicht vollständig, nach etwa 150 Minuten sind ca. 50% der Partikel noch nachweisbar. Die RNA-Synthese und die Translation in Virusenzyme und Strukturproteine beginnt.

Die DNA-Replikation geschieht innerhalb diskreter Orte im Zytoplasma, den sog. 'virus factories', und ist nach etwa 5 Stunden zu über 90% abgeschlossen. Die Morphogenese, bei der DNA, frühe und späte Strukturproteine und Lipide zu Viruskörperchen zusammengesetzt werden, beginnt.

Um das Nukleoid mit Lateralkörpern wird eine Hülle ge-

bildet. Innerhalb letzterer laufen dann wahrscheinlich weitere Reifungsprozesse ab. Durch ein Modellieren des Nukleoids wird das bikonkave Core geformt (BALACHANDRAN et al., 1979; MOSS, 1974).

Die Angaben über die maximale Anzahl der pro Zelle gebildeten Partikel schwankt zwischen etwa 500 (PAYNE, 1979) bis zu 10000 (MOSS, 1985) und ist abhängig von Zellart, Virusart und -stamm. Das Verhältnis von morphologischen Viruspartikeln zu infektiösen Einheiten beträgt etwa 4:1 (MOSS, 1974) und ist von der Adaptierung des Virusstammes abhängig. Die Veränderungen der infizierten Zelle beginnen an der Zellmembran mit Änderung ihrer Leitfähigkeit und der Zusammensetzung. Innerhalb weniger Stunden folgt die Abrundung von Zellen, bei bestimmten Pockenviren auch die Fusion mehrerer Zellen. Plaques im Zellrasen werden sichtbar (MOSS, 1974; APPLEBYARD et al., 1971).

2.8. Extra- und intrazelluläres Virus

Die reifen Viruspartikel wandern zur Peripherie der Viroplasmazonen. Während aber die meisten im Zytoplasma der infizierten Zellen verbleiben, werden wenige an intrazytoplasmatischen Membranen oder an der Zellmembran zusätzlich umhüllt und aktiv aus der Zelle ausgeschleust (APPLEBYARD et al., 1971). Sie bilden den extrazellulären Anteil des Nachkommenvirus (EZV), der weniger als 1% (CHERNOS et al., 1975) bis höchstens 10% (BOULTER und APPLEBYARD, 1973) ausmacht. PAYNE (1979) konnte diesen Anteil durch die Auswahl eines geeigneten Zellsystems (RK₁₃-Zellen) und VaV-Stammes (IHD-J) auf über 25% steigern.

Der Anstieg der Infektiosität beginnt 4-6 h p.i., das Maximum wird nach frühestens 15 Stunden erreicht.

PAYNE (1979) fand, daß das EZV eine Anzahl von hüllspezifischen Polypeptiden enthält, die es bei seiner Ausschleusung aus der Zelle durch das sog. Budding an intra-

zellulären Membranen oder der Zytoplasmamembran erhält und die hauptsächlich für die antigenen und immunogenen Unterschiede verantwortlich sind. Zusätzlich werden verschiedene Oberflächenproteine des Viruspartikels bei der Umhüllung quantitativ verändert (MOSS, 1974). Das spezifische Gewicht erniedrigt sich von 1,27 g/ml für IZV auf 1,23 g/ml für EZV (BALACHANDRAN et al., 1979; PAYNE, 1979; BOULTER und APPLEYARD, 1973).

Die Ernte des EZV erfolgt durch rechtzeitige Entnahme des Zellkulturmediums vor der Zellzerstörung. Es kann durch fraktionierte Zentrifugation und andere Methoden eingeeengt werden. Manche Autoren setzten dem Medium Anti-IZV-Serum zu, um den Anteil des EZV, der sich ansonsten wie IZV verhält, abzufangen (APPLEYARD et al., 1971; TURNER und SQUIRES, 1971 u.a.). Dieser Anteil wird mit 5-25% angegeben (PAYNE, 1979; HUTT, 1975a). In elektronenoptisch untersuchten EZV-Chargen wiesen etwa 90% der Partikel um die Doppelmembran eine 5-10 nm starken Hülle auf (HARRIS und WESTWOOD, 1964), die aber teilweise defekt war. Diese Defekte erlauben den Angriff auch von Antikörpern, die gegen intrazelluläres Virus gerichtet sind. IZV wird durch den Aufschluß der Zellen durch Gefriertauen (KERN, 1987), durch Ultraschallbehandlung (TURNER und SQUIRES, 1971) und andere Verfahren freigesetzt und anschließend gereinigt.

2.9. Paramunität und Immunität,

Ausbildung, zeitlicher Verlauf und beteiligte Systeme

Die Immunität, die durch eine Pockeninfektion induziert wird, ist komplexer Natur und sowohl humoral als auch zellulär verankert (MAHNEL, 1985). Daneben spielen auch die unspezifischen, sog. Resistenzmechanismen eine Rolle. Das VaV induziert zunächst eine starke Interferonbildung (HOCHSTEIN-MINTZEL et al., 1967). MAYR et al. (1975) wiesen nach der i.n. Applikation von 0,6 ml VaV-MVA, Titer $10^{7,5}$

KID₅₀/ml, an Kaninchen am 3. Tag Interferontiter von 256 - 1024 im Plaquereduktionstest gegen Sindbisvirus nach.

Interferone unterdrücken beim VaV das Uncoating und die Synthese früher und später Proteine, wahrscheinlich auf der Stufe der Translation.

Weitere Faktoren der Resistenz gegen Pockenviren sind das Komplementsystem (BALACHANDRAN et al., 1979; NISHIMURA et al., 1968; u.a.) und die Phagozytoseaktivität durch polymorphkernige und mononukleäre Phagozyten, die häufig komplement- oder antikörpervermittelt abläuft. So stellten BYRNE et al. (1983) einen Anstieg der Aktivität von spezifisch wirksamen NK-Zellen 24 Stunden nach der VaV-Infektion fest, die am 3. Tag ihr Maximum erreichte und nach 5 Tagen wieder zurückging. Gaben von Paramunitätsinducern, gewonnen aus Avipox- oder Parapox-Kulturvirus, führen neben anderen Effekten zu einer erheblichen Steigerung der natürlichen oder spontanen zellvermittelten Zytotoxizität, deren morphologisches Substrat NK-Zellen, zytotoxische Makrophagen, B- und T-Lymphozyten sind (BÜTTNER, 1984).

T-Immunzellen setzen Mediatoren frei, welche andere Zellen in den zellulären Abwehrmechanismus einbeziehen. Neben nicht antigenspezifischen Faktoren, wie Migrationshemmungsfaktor (MIF), NK-Stimulationsfaktor u.a. sind folgende antigenspezifischen Mediatoren nachgewiesen:

Leukozytenimmunfaktor (LIF), der spezifisch gegen VaV gerichtet ist (STICKL, 1965), und ein Transferfaktor, der nicht sensibilisierte T-Lymphozyten anregt, so daß sie nachfolgend mit Antigen reagieren können. Mit T-Lymphozyten, die diesen Faktor produzieren, können antigenspezifische, zelluläre Immunmechanismen passiv auf andere Tiere übertragen werden (HOCHSTEIN-MINTZEL, 1969; HUTT, 1975.b; STICKL, 1965).

MORISHIMA und HAYASHI (1978) zeigten sowohl bei Milzzellen als auch bei 'Menigeal Exsudat Zellen' von VaV-immunen Tieren im Test gegen mit VaV infizierte Mäuseembryofibroblasten eine ausgeprägte Fähigkeit zur Zytolyse, die bei

Behandlung mit Anti-T-Zell-Serum verschwand. Diese zytolytisch wirksamen Zellen nahmen in ihrer Anzahl ab dem 5. Tag p.i. zu und erreichten ihr Maximum am 7. Tag p.i.. Die Vielzahl der miteinander verbundenen zellulären und anderen Faktoren führt zu einer Gewebeimmunität (STICKL, 1965). Dabei wirken NK-Zellen, Nullzellen, zytotoxische Makrophagen, B- und T-Lymphozyten, Antikörper und Komplement zusammen (BÜTTNER, 1984; BALACHANDRAN et al., 1979). Durch die Lösung infizierter Zellen aus dem Zellverband, durch die Zerstörung solcher Zellen und durch eine Hemmung der Virussynthese gelingt es, das ungestörte Wandern der Pockenviren von Zelle zu Zelle zu verhindern. Pockenviren gelangen in den interzellulären Raum, wo sie dem Angriff von Antikörpern ausgesetzt sind (ROLLE und MAYR, 1978). B-Lymphozyten bilden auf einen Antigenreiz hin, den das VaV setzt, entsprechend der großen Anzahl antigener Determinanten, eine Vielzahl verschiedener Antikörper (siehe: Antigene von Orthopoxviren, S.5).

Bei seinen Untersuchungen zum zeitlichen Verlauf der AK-Bildung gelang HUTT (1975a) bereits am 6.Tag p.i. der Nachweis von AK gegen VaV-EZV, der festgestellte Titer betrug bereits 1:25. Ein erstes Maximum der Anti-EZV-AK war am 8.Tag mit dem Titer von 1:450 erreicht, ein zweites am 17.Tag mit dem Titer von 1:400. Einen ähnlichen biphasischen Verlauf zeigte auch der Anstieg der AK gegen IZV mit einem Maximum am 14. (Titer 1:500) und am 28.Tag p.i. (Titer 1:21800). Die Ursache des biphasischen Verlaufs erklärt er mit dem zeitlich etwas verschobenen Auftreten der AK der Subklassen IgM (1.Maximum) und IgG, und dem schnellen Verschwinden von IgM, auch nach erneuter Antigenzufuhr.

Die Bedeutung dieser Antikörper ist, von Ausnahmen abgesehen, noch nicht klar. Auch über die gegenseitige Beeinflussung verschiedener Antikörper gegen verschiedene oder die gleichen antigenen Determinanten, über synergistisches oder störendes Verhalten ist wenig bekannt.

Interessant ist in diesem Zusammenhang die Darstellung von DUNLAP und BARKER (1973), die bei dem US-Smallpox-Referenzvakzinestamm CL, aus Kälberlymphe gewonnen, feststellten, daß dieser Stamm sich bemerkenswert resistent gegen eine Neutralisation durch Anti-VaV-Serum zeigte, durch die Zugabe von Komplement oder Anti-Rind-Gammaglobulinen aber in Abwesenheit von Anti-VaV-Serum neutralisiert werden konnte. Sie formulierten die Hypothese, daß frühe Antikörper des Kalbes die Virusantigene erkennen und besetzen können, ohne zur Neutralisation fähig zu sein; gleichzeitig verhindern die AK des Kalbes den Angriff neutralisierender AK des Anti-VaV-Serums und unterdrücken so die Neutralisation des VaV. Auch LAFFERTY (1965) beschrieb solche Interaktionen zwischen verschiedenen AK eines Anti-VaV-Serums.

Die Bedeutung hämagglutinationshemmender (hah) AK wird unterschiedlich dargestellt. Als mögliche Angriffspunkte dieser AK diskutieren BOULTER und APPELYARD (1973)

1. die Anlagerung an HA-Strukturen an der Oberfläche infizierter Zellen, mit nachfolgender Zytolyse,
2. die Anlagerung an das HA des behüllten Viruspartikels (EZV) und Neutralisation, bzw.
3. in Verbindung mit Komplement, Zerstörung der Hülle und damit Freisetzen der unter der Hülle gelegenen Antigene für den Angriff neutralisierender AK gegen IZV.

Von ihnen wird die Bestimmung des hah-AK-Titers als aussagekräftiger Nachweis einer Immunität gegen VaV beschrieben.

BULLER und WALLACE (1985) bezeichnen die Untersuchungen dagegen als relativ unsensibel und unspezifisch.

Auch RODRIGUEZ et al. (1985) stellten die Beziehung zwischen den Titern der hah Antikörper und einer effektiven Immunität in Frage.

MAHNEL und MUNZ (1965) schließlich stellten fest, daß bei der Infektion von Babymäusen mit Variolavirus nur nach der i.p. Applikation hah AK gebildet wurden, daß über die

Placenta immuner Muttertiere hah AK nicht auf die Jungen Übertragbar waren, die Jungtiere ohne diese AK sich aber gegenüber einer Kontrollinfektion in gleichem Maße immun zeigten wie Tiere mit hah AK.

Mindestens 20 verschiedene AK ließen sich nach BOULTER und APPEYARD (1973) durch die Immunodiffusion in VaV-Antiserum nachweisen und mindestens einer davon reagierte mit den Membranen infizierter Zellen. Die Autoren vermuteten, daß Antikörper in Verbindung mit Komplement die Zellmembran soweit zu schädigen in der Lage sind, daß neutralisierende AK in die Zelle eindringen können und dort sich befindliche Viruspartikel neutralisieren. Zusätzlich können auch Zellen lysiert werden, bevor die Virusreifung abgeschlossen ist. Solche Effekte wurden bei anderen Viren bereits bewiesen. NISHIMURA et al. (1968) wiesen komplementfixierende AK nach, die bei Zusatz von Komplement im Neutralisationstest wirksam waren.

Im Serum gegen vermehrungsfähiges VaV und gegen EZV beschrieben BALACHANDRAN et al. (1979) AK, die in Anwesenheit von Komplement fähig sind, infizierte, mit ^{51}Cr markierte Babyhamsternierenzellen zu lysieren. Im ^{51}Cr -Freisetzungstest konnte sie 50%-Endpunkttiter von 1:80 bzw 1:128 in Seren von Kaninchen nachweisen, die mit vermehrungsfähigem bzw. inaktiviertem EZV immunisiert worden waren. Seren, die gegen inaktiviertes IZV gerichtet waren, enthielten diese Antikörper nicht. Durch Adsorption der Seren an Membranen infizierter Zellen ging die zytolytische Komponente vollständig verloren, auch die Titer im Neutralisationstest gegen EZV waren erheblich erniedrigt, woraus zu folgern war, daß ähnliche neutralisierende antigene Determinanten auf der Oberfläche von EZV und infizierten Zellen gegenwärtig sind.

Mit MAK gelang es RODRIGUEZ et al. (1985) einen anderen Neutralisationsmechanismus zu erhellen, indem sie zeigten, daß die Antigen-AK-Bindung nicht die Anlagerung oder die

Aufnahme des Virus in eine empfängliche Zelle einschränkte, sondern das Uncoating verhinderte.

In Zellen, die mit VaV infiziert wurden, das mit MAK neutralisierender Klone inkubiert worden war, blieb die Freisetzung des subviralen Cores aus den Virionen stark herabgesetzt. Zusätzlich vermuten die Autoren auch einen Einfluß des AG-AK-Komplexes auf die Penetration der Viruspartikel.

Ein anderer Neutralisationsmechanismus wird beim VaV für polyklonales Serum angenommen. Hier soll vor allem durch das sog. Coating der Pockenviren, also durch ein Anheften von mehreren verschiedenen bivalenten AK eine sterische Behinderung bewirkt werden, die weitgehend eine Adsorption der Partikel an empfängliche Zellen verhindert. Diese Viren bleiben außerhalb der Zellen und damit dem Angriff neutralisierender AK ausgesetzt (RODRIGUEZ et al., 1985). Bei den Partikeln aber, die in Zellen eindringen können, ist ebenfalls eine starke Verminderung des Uncoatings festzustellen. Sie werden in Phagolysosomen eingeschlossen und abgebaut. Als Ursache für die Verminderung des Uncoatings wird das Blockieren einer RNA-Polymerase diskutiert, die noch vor dem Uncoating RNS synthetisieren kann, welche in ein Freisetzungsprotein translatiert wird. Diese Vorstellung kann auch die Vorgänge verschiedener Inaktivierungsmodi und der nicht genetischen Reaktivierung inaktivierter Viren durch unbehandelte intakte Virionen erklären (MOSS, 1974; ABEL, 1962).

Eine andere Erklärung des Neutralisationsmechanismus geht von einer Konformationsänderung durch die Bindung von AK an immunisierende Epitope des Virus aus, die Auswirkung auf die Anheftung der Viren an Zellen und auf das Uncoating hat (DIMMOCK, 1984).

SCHLEGEL und WADE (1983) schließlich konnten zeigen, daß durch Antikörper neutralisiertes VSV (Vesikuläres Stomatitis Virus) an andere Zellrezeptoren bindet und sogar vermehrt aufgenommen werden kann. Die aufgenommenen Viren

werden aber sofort in Endosomen eingeschlossen und in Lyso-somen abgebaut. Ein Grund dafür könnte ebenfalls eine Konformationsänderung durch die Interaktion zwischen AK und antigenen Determinanten des Virus sein, die zur Freilegung neuer Domänen führen und so die Aufnahme in die Zelle vermitteln könnte.

Die Autoren verweisen auf ähnliche Erkenntnisse für das Vacciniavirus.

2.10. Aktive Immunisierung

Die erste aktive Immunisierung führte Jenner im Jahre 1796 mit Lymphe der `Kuhpocke` eines infizierten Mädchens bei einem Knaben durch (BAXBY, 1981). Die induzierte Immunität schützte den Knaben bei einer später durchgeführten Variolation mit Menschenpockenvirus vor der Erkrankung. Das VaV (Vakzine=Impfstoff) wird bzw. wurde zur Schutzimpfung gegen verschiedene Pockenviruserkrankungen eingesetzt und kann aufgrund der sehr engen antigenen Verwandtschaft innerhalb der Orthopoxviren eine solide und langanhaltende Immunität gegen die anderen Orthopoxviren induzieren (MAYR, 1957).

So wurden die Erfolge der aktiven Immunisierungen gegen Menschenpocken (HOCHSTEIN-MINTZEL et al., 1975), gegen Mäusepocken (MAHNEL, 1985), gegen Elefantenpocken (MAYR et al., 1975), gegen Kaninchenpocken (BOULTER et al., 1971) und andere Orthopocken auf der Basis von heterologen vermehrungsfähigen VaV beschrieben.

Auch hochempfindliche Tiere (Babymäuse, mit Gammastrahlung bestrahlte Ratten, u.a.) konnten auf diese Weise geschützt werden.

Dabei sind sowohl parenterale (i.v., i.p.), als auch lokale Applikationen (Aerosol, Trinkwasser, i.d.) des Impfvirus bekannt.

Ein Problem der aktiven Immunisierung mit vermehrungs-

fähigem VaV stellen neben der relativ hohen Ausscheidung und Verbreitung des Impfvirus (MAHNEL, 1985; BULLER und WALLACE, 1985) v.a. die Impfkomplikationen bei Mensch und Tier dar, die z.T. auf die Vermehrung des VaV (Encephalitiden, generalisierte Vacciniaerkrankung u.a.), z.T. auch auf eine allergisierende Komponente zurückgeführt werden (LANE et al., 1969). Aus diesem Grund wurde nach weniger pathogenen Stämmen gesucht bzw. versucht, durch Adaption der VaV-Stämme an verschiedene Wirtssysteme ihre pathogenen Eigenschaften zu reduzieren.

Auch die simultane Gabe von Gammaglobulinen (=Simultanimpfung) und eine Vorimpfung mit Vakzinen aus inaktiviertem VaV (Vaccinia-Antigen) wurden zur Senkung der Komplikationsraten vorgeschlagen. Vaccinia-Antigen wird aus vollvirulentem VaV durch Inaktivierung mit Formalin gewonnen. Dabei werden das Nucleoprotein zerstört, die Proteine teilweise denaturiert und das Lipoprotein der Hülle, das eigentliche Allergen, bleibt erhalten (STICKL et al., 1974). Es entsteht keine belastbare Immunität, nur eine kurzzeitige zelluläre Allergie, die aber ausreicht, eine Wiederimpfung mit vermehrungsfähigem Virus in ihrem Verlauf wesentlich abzuschwächen (MAHNEL, 1960).

Durch schonendere Inaktivierungsmechanismen wie die UV-Bestrahlung oder die Erhitzung bleiben die antigenen Determinanten des VaV weitgehend erhalten und bilden den Stimulus für eine Immunantwort des Impflings. Dabei konnte durch die Verabreichung von inaktiviertem Virusmaterial mit Adjuvanzzusatz die Höhe und die Dauer der Antikörperantwort beim Kaninchen stark positiv beeinflusst werden (BOULTER et al., 1971).

Die Applikation einzelner Antigene wie lösliche AG, Oberflächentubulusprotein mit 58 KD Molekulargewicht u.a. an Versuchstiere führt ebenfalls zu einer Immunantwort, in deren Verlauf monospezifische AK mit neutralisierenden Eigenschaften gebildet werden können.

Die Tatsache, daß die Qualität der zugeführten Antigene die Qualität und Quantität der stimulierten Antikörper bestimmt, erklärt auch die unterschiedlichen Ergebnisse bei Überprüfungen der erworbenen Immunität nach einer aktiven Immunisierung. Mit löslichen Antigenen führte sie zu einer vollständigen Immunität gegen VaV (APPLEYARD und WESTWOOD, 1964). Nach der Immunisierung mit inaktiviertem intrazellulären Virus wurden nur AK gegen IZV festgestellt (TURNER und SOUIRES, 1971), inaktiviertes extrazelluläres VaV induzierte AK gegen EZV wie auch IZV (BALACHANDRAN et al., 1979). Die Immunität gegen inaktiviertes IZV schützte Kaninchen vor einer Challengeinfektion mit einer letalen Dosis VaV, konnte aber eine massive Erkrankung nicht verhindern, wogegen die Immunität gegen inaktiviertes EZV die Erkrankung wesentlich milder verlaufen ließ und z.T. auch eine lokale Immunität beinhaltete (BOULTER, 1969; BOULTER und APPLEYARD, 1973).

Eine Neutralisierung des EZV, das aus infizierten Zellen ausgeschleust wird und für die Weiterverbreitung im Körper verantwortlich gemacht wird, kann daher eine Generalisierung des VaV verhindern.

BOULTER et al. (1971) charakterisierten die Immunität, die gegen vermehrungsfähiges bzw. inaktiviertes VaV gebildet wird, folgendermaßen:

Vermehrungsfähiges VaV induziert

1. neutralisierende Antikörper (humorale Immunität),
2. eine Resistenz gegen i.d. Reinfektion (zelluläre Komponente) und
3. eine Immunität gegen eine Reinfektion mit letaler Dosis (komplexe Immunität); diese Immunität ist passiv Übertragbar.

Inaktiviertes Virus induziert

1. neutralisierende Antikörper,
2. eine Immunität gegen eine letale Erkrankung, nicht aber gegen die i.d. Challengeinfektion, versagt also in der Induktion einer zellulären Immunität.

2.11. Passive Immunisierung

Vacciniahyperimmungammaglobuline (VHIG) wurden vor allem bei der Impfung gegen Menschenpocken zur Vermeidung von Impfkomplicationen eingesetzt (Leading article, Brit. Med. J., 1970)

KEMPE et al. (1961) berichteten über den Einsatz von VHIG, das sie von aktiv immunisierten Spendern gewonnen hatten und das neutralisierende AK-Titer von 1:256-1:512 aufwies. Sie versuchten damit Kontaktpersonen von Variolakranken zu schützen und konnten die Ansteckungshäufigkeit in ihrer Versuchsgruppe gegenüber der Kontrollgruppe um etwa 75% senken. KEMPE (1960) gelang es auch durch VHIG den Verlauf und die Mortalität bei menschlichen Impfkomplicationen entscheidend positiv zu beeinflussen.

Am Modell der Kaninchenpockeninfektion untersuchten BOULTER et al. (1961) den Wert einer Serotherapie beim Auftreten erster Erkrankungssymptome. Vor diesen Versuchen war man davon ausgegangen, daß die Gabe von Immunserum keine Bedeutung bei Viruserkrankungen mehr haben kann, sobald die ersten Krankheitssymptome aufgetreten sind.

Theoretisch können AK einen Effekt nur bewirken, wenn sie mit Virus in Kontakt treten. Bei der Virusausbreitung von Zelle zu Zelle ist dies nicht gegeben, jedoch im Stadium einer Generalisierung, der Ausschwemmung von Virus über die Blutbahnen. Krankheitssymptome entwickeln sich erst, wenn das Virus bereits die sekundär affinen Organe erreicht hat, die erste Generalisierung also bereits stattfand.

BOULTER et al. (1961) konnten Kaninchen mit Hyperimmunserum gegen die Pockenausbildung zu verschiedenen Zeitpunkten nach der Infektion schützen, auch wenn bereits allgemeine Krankheitssymptome aufgetreten waren. Ein Schutz gegen letale Infektionen war bis zum 3. Tag nach Fieberbeginn möglich. Überraschend blieb die relativ geringe Bedeutung des Antikörpertiters auf die Schutzwirkung.

Sie folgerten aus den Ergebnissen, daß nicht nur freies Virus durch passiv applizierte VaV-AK neutralisiert werden kann, sondern auch die lokale Verbreitung des Virus von Zelle zu Zelle blockierbar ist.

Die qualitativen und quantitativen Verhältnisse bei der Übertragung einer aktiv erworbenen Variolaimmunität von Muttertieren auf ihre Neugeborenen untersuchten HAHNEL und MUNZ (1965). Sowohl bei Muttertieren, die im Verlauf der Trächtigkeit mehrmals immunisiert worden waren, als auch bei solchen, wo dies nur einmal vor dem 12. Trächtigkeitstag erfolgte, wurden neutralisierende AK diaplazentar und trophogen auf ihre Jungen übertragen. Die Babymäuse waren passiv geschützt und überlebten Testinfektionen mit bis zu 1000 LD₅₀ Variolavirus. Im Rahmen einer Impstoffwertigkeitsprüfung bestätigte HOCHSTEIN-MUNTZEL (1969) den Erfolg der passiven Immunisierung. Mit Serum und Milzzellen VaV-immuner Altmäuse ließ sich ein Schutz auf Babymäuse übertragen. Er nahm an, daß durch die adoptive Immunisierung mit Milzzellen antikörperbildendes Potential und andere Immunphänomene übertragen werden, während die mit Serum von den mit VaV-Antigen immunisierten Spendermäusen übertragenen AK nicht vor der Belastungsinfektion schützen konnten.

Weitere Versuche zeigten dann, daß die durch die Applikation von OPV-Immunserum bei Versuchstieren erzielbare Schutzwirkung vor allem abhängig ist vom Virusmaterial, mit dem immunisiert worden war (BOULTER et al., 1971). Wurde zur Immunisierung der Serumspender vermehrungsfähiges Virus (VaV oder Kaninchenpocken) verwendet, war mit diesem Serum (1= Anti-LV-Serum) meist ein vollständiger Schutz gegen eine Belastungsinfektion mit ansonsten letaler Dosis zu erreichen (SVET-MOLDASKAYA und MATSEVICH, 1969). Immunserum von Spendern, die mit inaktiviertem Virus (2= Anti-IAV-Serum, meist gegen IZV) immunisiert worden waren, dagegen zeigte sich wenig wirksam. Tiere, denen (2) appliziert wurde, erkrankten nach einer Belastungsinfektion schwer,

einige starben im Verlauf der Infektionskrankheit, obwohl in (2) teilweise um hundertfach höhere AK-Titer nachgewiesen wurden (BOULTER, 1969; u.a.). Diese Ergebnisse wurden für Challengeinfektionen nach kutaner, i.v. und i.p. Applikation bestätigt. Bei der i.cer. Applikation der Belastungsdosis, wie sie TURNER und SQUIRES (1971) durchführten, war durch die i.p. Gabe von Immunseren dagegen kein Schutz zu erzielen.

Auch BOULTER et al. (1961) konnten nur mit Immunseren gegen vermehrungsfähiges Virus, nicht aber mit Serum gegen inaktiviertes Virus Empfänger gegen eine letale Challengeinfektion schützen. Sie vermuteten, daß die Immunität, die durch inaktiviertes VaV stimuliert wird, v.a. auf nicht humoraler Grundlage basiert.

Die intracerebrale Challengeinfektion mit 56 LD₅₀ führte bei mit Kaninchenhyperimmunserum gegen vermehrungsfähiges und inaktiviertes Virus geschützten Mäusen bei beiden Gruppen zum Tod (TURNER und SQUIRES, 1971).

Bei der i.n. Challengeinfektion dagegen konnten BOULTER et al. (1971) Kaninchen durch Gabe von Serum schützen. Serum gegen vermehrungsfähiges VaV (1) verhinderte nach der Applikation einer letalen Dosis sowohl den Tod als auch das Auftreten von Krankheiterscheinungen, während Serum gegen inaktiviertes VaV (2) nur etwa 50% der infizierten Tiere vor dem Tod und keines der Tiere vor einer Erkrankung bewahren konnte, obwohl in (2) ein um etwa das 100fache höherer AK-Titer nachgewiesen werden konnte.

2.12. Überprüfung einer Immunität

Der Nachweis einer Immunität gegen OPV kann mit drei verschiedenen Verfahren geführt werden:

1. Nachweis der Bildung von AK (neutralisierend u/o hah u/o komplementbindend u/o präzipitierend) und Bestimmung ihrer Titer;

2. Intensität von Hautreaktionen (Pockenbildung) nach intrakutaner Infektion mit verschiedenen Virusverdünnungen;

3. Schutz vor einer letalen Belastungsinfektion.

Alle drei Verfahren geben Hinweise auf die ausgebildete Immunität, die Ergebnisse aber korrelieren nicht unbedingt miteinander (BOULTER and APPLEYARD, 1973; SVET-MOLDAVSAYA and MATSEVICH, 1969; MAHNEL, 1985).

Die neutralisierenden und die komplementbindenden Antikörper gelten als wesentlich für eine Immunität (AMIES, 1962; JACOBY et al., 1983)

Die Bedeutung der hah und präzipitierenden AK wird verschieden beurteilt (vgl. 2.9.). Der Nachweis präzipitierender AK gelingt im Agargelpräzipitationsverfahren nach Ouchterlony (STICKL, 1965). Hah AK werden nachgewiesen aufgrund ihrer Fähigkeit, die Hämagglutination geeigneter Hühnererythrozyten durch VaV zu verhindern (BRIODY, 1959). Im ELISA reagieren alle AK, die Affinität zu OPV besitzen und genügend avide sind.

Die Bestimmung der neutralisierenden Aktivität von OPV-Immunseren wird im allgemeinen im Plaquereduktionstest (PRT) durchgeführt, da es nicht gelingt, alle infektiösen plaquebildenden Einheiten (PFU) zu neutralisieren.

Neutralisationsgemische, gleiche Volumina Serumverdünnung und Virussuspension werden auf empfängliche Systeme, bebrütete Hühnereier (CHERNOS et al.; 1975; BOULTER et al., 1971 u.a.) oder Zellkulturen verimpft. Eine Reduktion der gebildeten Plaques um 50% und mehr gegenüber einer Virus-Normalserum-Kontrolle wird als positive Reaktion gewertet. Weitere Nachweisverfahren, mit denen auch spezifische Serumaktivitäten gegen JZV und EZV ermittelt werden, sind der ⁵¹Cr-Freisetzungstest, das Immunofluoreszenzverfahren und der Antikomettest.

Der ⁵¹Cr-Freisetzungstest macht die Aktivität zytolytisch wirksamer Antikörper messbar. Es kommt zur Zerstörung infizierter Zellen und dadurch bedingt zur Freisetzung von

radioaktiv markiertem ^{51}Cr (BÜTTNER, 1984; BALACHANDRAN, 1979). Beim Antikomet-Test wird durch ein geeignetes Serum die Verbreitung von EZV über das Medium infizierter Zellkulturen verhindert. Die Ausbildung der ansonsten typischen Kometform mit dem primären Plaque, der den Kopf und sekundären und tertiären Plaques, die den Schweif des Kometen bilden, unterbleibt (APPLEYARD et al., 1971; BALACHANDRAN et al., 1979). Wie in 2.11. angesprochen, zeigten sich auch in diesen in-vitro-Testen Unterschiede zwischen den Immunseren, in Abhängigkeit vom zur Immunisierung verwendeten Virusmaterial.

BOULTER und APPLEYARD (1973) vermuteten die Ursache dieser Varianzen in Unterschieden der gegen EZV und IZV gebildeten Antikörper. Zur Klärung dieser Fragestellung setzten sie diese Seren den Medien infizierter Zellkulturen zu. Anti-LV-Serum (1) reduzierte die Virusinfektiosität in der Mediumphase, stark und unterdrückte die sog. Kometbildung, Serum gegen IZV dagegen zeigte keinen Einfluß. APPLEYARD et al. (1971) untersuchten beide Seren mit der Immunofluoreszenztechnik. Wurden die infizierten Zellen vor der Seruminkubation nicht fixiert, war mit Anti-LV-Serum AK-Aktivität nachzuweisen, die sich als breiter granulärer Fluoreszenzsaum an der Oberfläche der Zellen abbildete, während Serum gegen inaktiviertes Virus (2) keine Aktivität entwickelte. Beide Seren reagierten aber gegen Antigenstrukturen im Zellinneren, als die Zellen vor der Untersuchung fixiert wurden. Im PRT neutralisierte (1) IZV und EZV, (2) dagegen nur IZV. Im Antikomettest war nur Anti-LV-Serum wirksam. Diese Ergebnisse bestätigten auch TURNER und SQUIRES (1971).

Mit dem ^{51}Cr -Freisetzungstest konnten BALACHANDRAN et al. (1979) nur im Anti-EZV-Serum Antikörper nachweisen, die spezifisch an infizierte Zellen banden und zytolytisch wirksam waren.

Besondere Verhältnisse scheinen nach der Immunisierung mit inaktiviertem EZV zu bestehen. BOULTER und APPLEYARD (1973)

konnten in solchen Immunseren von Kaninchen keine neutralisierenden AK nachweisen. BALACHANDRAN et al. (1979) stellten dagegen in Antiserum gegen inaktiviertes EZV (VaV) neben der Aktivität gegen EZV auch AK fest, die IZV neutralisierten.

Durch die Adsorption der Seren vor dem Einsatz in den Nachweisverfahren an verschiedene Antigene, EZV, IZV oder Zellmembranen infizierter Zellen, lassen sich bestimmte AK-Aktivitäten abtrennen und damit einzelne Bereiche des Wirkungsspektrums getrennt erfassen (BALACHANDRAN et al., 1979; APPELYARD et al., 1971; u.a.)

Eine Adsorption von Anti-LV-Serum (1) an IZV senkte die AK-Titer im PRT gegen IZV um mehr als 90% gegenüber dem Ausgangswert, die Titer gegen EZV nur um 50%, nach Adsorption von (1) an EZV betrugen die Titer gegen EZV nur mehr 5% des Ausgangswertes, gegen IZV war kein signifikanter Abfall zu beobachten. Diese Ergebnisse veranlaßten die Autoren von verschiedenen AK gegen EZV und IZV zu sprechen, von denen sie den AK gegen EZV die für die Immunität überragende Bedeutung zugestehen (APPELYARD et al., 1971).

Weitere Möglichkeiten des Nachweises einer belastbaren Immunität gegen OPV bestehen in der Verwendung von Infektionsmodellen (Challengeinfektionen). Der Vergleich der Reaktion nicht immuner Probanden (Kontrollen) mit der vorbehandelter Tiere auf eine Belastungsinfektion gestattet eine Aussage über die Ausbildung einer Immunität. Dabei ist zu beachten, daß jede bestehende Immunität mit einer starken Infektionsdosis durchbrochen werden kann. Eine massive Infektion wird also das Reaktionsbild vollständig verwischen (MAHNEL, 1960).

Die intrakutane Belastung mit OPV-Material dient dem Nachweis einer lokalen Immunität. STICKL (1965) bezeichnete die spezifische Reaktionsfähigkeit von Zellen und Geweben auf ein sensibilisierendes Antigen (im Versuch VaV) als sehr wichtig für den Ablauf von Viruserkrankungen. Er unterschied zwischen der Gewebeimmunität und der Gewebeallergie

und charakterisierte letztere als eine spezifische, vorwiegend proliferativ ausgerichtete Gewebeantwort auf das korrespondierende Antigen.

MAHNEL (1960) beschrieb das Reaktionsbild nach der intrakutanen Schnittimpfung mit vermehrungsfähigem VaV bei vorbehandelten Kaninchen:

Immunitätsreaktion: Die Reaktionen laufen wesentlich schneller ab als bei der Erstimpfung. Es kommt auf den Impfschnitten zu keiner Pockenbildung, die Schnitttrötung ist gering. Es bilden sich nur kleine Strichschorfe, die bereits ab dem 5.Tag wieder abzufallen beginnen.

Die unvollkommene, unterdrückte Pustelreaktion läßt nur einen kurzen pustelartigen Ansatz erkennen und verläuft ebenfalls stark beschleunigt. Ähnliche Ergebnisse wurden auch für Versuche an vorbehandelten Mäusen beschrieben (BRIODY, 1959).

Andere Autoren bevorzugten die Immunitätsüberprüfung mit einer letalen Belastungsinfektion. Für BOULTER et al. (1971) ist weder die AK-Antwort noch die Resistenz gegen eine intradermale Challengeinfektion, sondern alleine ein Schutz gegen eine ansonsten letal verlaufende Infektion beweisend für eine belastbare Immunität. Sie applizierten in ihren Versuchen eine Dosis, die bei 75% der unbehandelten Kaninchen zum Tode führte. Es gelang ihnen bei aktiv und passiv immunisierten Tieren eine belastbare Immunität nachzuweisen. Kaninchen, denen Serum gegen inaktiviertes Virusmaterial verabreicht wurde, entwickelten zwar schwere Krankheitserscheinungen, gegen den letalen Verlauf der Erkrankung waren sie aber geschützt.

Andere Autoren bevorzugten eine massive Belastungsinfektion und applizierten zwischen 26 und 50 LD₅₀ intracerebral (SVET-MOLDAVSKAYA und MATSEVICH, 1969; TURNER und SQUIRES, 1971), 100 LD₅₀ intraperitoneal (HOCHSTEIN-MINTZEL, 1969), 1000 LD₅₀ i.p. (MAHNEL und MUNZ, 1965) und bis zu 10 000 LD₅₀ intracerebral (CHERNOS et al., 1976). Auch bei diesen

hohen Dosen schützte eine Immunität die infizierten Tiere vor dem tödlichen Ausgang der Erkrankung.

3.1 Material und Methoden:

3.1.1. Abkürzungen

In der vorliegenden Arbeit wurden häufig wiederkehrende Begriffe aus Platzgründen abgekürzt. Es folgt eine Aufstellung dieser Abkürzungen:

OPV:	Orthopockenviren
VaV:	Vacciniavirus
EZV:	Extrazelluläres Virus, aktiv aus infizierten Zellen ausgeschleuster Anteil
IZV:	Intrazell. Virusanteil, der in infiz. Zellen verbleibt
GV:	Gesamtvirus, bestehend aus EZV und IZV
LV:	Lebend-, bzw. vermehrungsfähiges Virus
IV:	Inaktiviertes Virus
AG:	Antigen
AK, MAK:	Antikörper, monoklonale Antikörper
AIK:	Antiidiotypantikörper
VHIG:	Vacciniahyperimmungammaglobuline
HA:	Hämagglutinin
HAH:	Hämagglutinationshemmung
NT:	Neutralisationstest
PRT:	Plaquereduktionstest
PFU, PBE:	plaque forming units, oder Plaquebildende Einheiten
cpE:	cytopathischer Effekt
KID ₅₀ :	50% Kulturinfektiöse Dosen
Maus-ID ₅₀ :	50% infektiöse Dosen für das Versuchstier Maus
Maus-LD ₅₀ :	50% letale Dosis für das Versuchstier Maus
CAM:	Chorioallantoismembran von Hühnerembryonen
MG:	Molekulargewicht, angegeben in
KD:	Kilodalton

Der Stamm VaV-M1 wurde zur Virulenzsteigerung sechsmal in Babymausgehirnen passagiert und dann einmal auf MA-Zellen vermehrt.

3.1.4 Versuchstiere

Für die Untersuchungen wurden ausschließlich junge erwachsene Mäuse im Alter von 7-12 Wochen folgender Zuchtstämme verwendet:

- Balb-C (institutseigene Züchtung);
- NMRI;
- DBA 2;

Es handelt sich um Inzuchtstämme mit hoher genetischer Einheitlichkeit. Bevorzugt wurden weibliche Tiere herangezogen. Gehirnpassagen zur Virulenzsteigerung des VaV-M1 erfolgten in 9-12 Tage alten Balb-C-Babymäusen beiderlei Geschlechts.

3.1.5 Titrierung der Infektiosität

Die Bestimmung des Gehalts an infektiösem Virus erfolgte für alle in den Versuchen eingesetzten Virussuspensionen im Mikrotestverfahren auf MA-Zellen, unter Auswertung von Verdünnungsstufen in Zehnerpotenzen.

Bei Material der 1. und 2. Passage des VaV-M1 wurde sie auf den in 3.1.2. genannten Zell-Linien vergleichend in Röhrchenkulturen und in Mikrotest-Kulturen durchgeführt.

Mikrotestverfahren:

Pro Verdünnungsstufe wurde 1 Reihe der 96-Loch Platte (8 Löcher) angesetzt, in jedes Loch der Reihe 0,05 ml der entsprechenden Virusverdünnung, in die Löcher für die Zellkontrollen je 0,05 ml des Mediums ohne FKS vorgelegt. Anschließend wurde in jedes Loch 0,1 ml der vorbereiteten

Zellkultursuspension eingesät, die Platten verschlossen und bei 37°C bebrütet.

Röhrchenkulturen:

Pro Verdünnungsstufe wurden 3 Röhrchen eingesetzt. Das Zellkulturmedium wurde abgesaugt, die Zellen zweimal mit PBS gewaschen und dann mit 0,15 ml der Virusverdünnungsstufe beimpft. Nach 30 min Adsorptionszeit bei 37°C wurde mit Zellkulturmedium auf 1,5ml ergänzt.

Auswertung:

Sie erfolgte anhand des cpE nach 7-tägiger Bebrütung bei 37°C. Der Virusgehalt (bzw. Infektiositäts-Titer) wurde nach der Endpunktmethode in 50% kulturinfektiösen Dosen (KID_{50}) pro Volumeneinheit nach der Methode von SPEARMAN und KAERBER berechnet. Die Titerangaben beziehen sich stets auf 1 ml.

3.1.5 Virusvermehrung und Virusreinigung

Gewinnung von extrazellulärem Virus (EZV):

MA-Zellen wurden mit VaV-M1 in einem Virus-Zell-Verhältnis von ca. 0,1 KID_{50} beimpft, nach einer Stunde Adsorption zweimal mit PBS gewaschen und mit Erhaltungsmedium überschichtet. Nach 12 Stunden wurden die Zellkulturen mikroskopisch kontrolliert, nur aus Zellkulturflaschen ohne cpE das Medium abgenommen und zur Gewinnung des EZV herangezogen. Diese Fraktionen wurden durch fraktionierte (Ultra-) Zentrifugation gereinigt und eingengt.

Zuerst wurde Zelldetritus niedertourig bei 1700g während 20 Minuten abzentrifugiert, dann der Überstand in einer MSE-Kühlzentrifuge 90 min bei 11000 U/min pelletiert, das Viruspellet in Tris-Puffer aufgenommen, diese Suspension erneut niedertourig zentrifugiert und das Virus (Überstand) anschließend in einer Ultrazentrifuge, SW 28-Rotor 90 min

bei 25000 U/min. sedimentiert. Das Sediment wurde abschließend in PBS gelöst.

Gewinnung von intrazellulärem Virus (IZV):

Von beimpften Zellkulturen wurde das Medium abgenommen, die Zellen zweimal mit PBS gewaschen, erneut mit Zellkulturmedium überschichtet und bei -20°C gelagert. Die weitere Behandlung erfolgte analog der für Gesamtvirus.

Ernte von Gesamtvirus:

Das VaV-M1 wurde 6x aufeinanderfolgend in Gehirnen von Babymäusen vermehrt. Die Tiere verendeten 36-50 Stunden nach der Infektion. Verwendet wurden nur Gehirne von Tieren, die nach Auftreten von massiven Krankheiterscheinungen getötet worden waren oder deren Tod weniger als 2 Stunden zurückerlag.

Die Gehirne wurden unter sterilen Kautelen gewonnen, mit Seesand verrieben, in der 10fachen Menge PBS aufgenommen und durch niedertourige Zentrifugation gereinigt.

In gleicher Weise wurden z. T. auch Organverreibungen von Leber, Milz, Lunge und Herz von infizierten adulten Tieren hergestellt und auf ihren Virusgehalt titriert.

Als Zellkultur-Gesamtvirus (aus Zellen und Medium) diente die Ernte 40 Stunden p.i. (etwa 80 -90% cpE). Sie wurde bei -20°C gelagert und anschließend aufgetaut (Gefriertauen). Durch intensive Ultraschallbehandlung wurden die Zellen dann aufgeschlossen, Zelltrümmer 30 min bei 2000 g abzentrifugiert und der Überstand als Gesamvirussuspension abgenommen.

Alle Virussuspensionen wurden portioniert bei -70°C gelagert.

3.1.6 Vermehrungskurve von intra- und extrazellulärem Virus

Sie wurde an Einschichtzellkulturen von MA-Zellen für das VaV-M1 der 9.FHE-, 6.Maus-, 1.MA-Passage über die Titrierung serienweise entnommener Proben in Röhrchenkulturen ermittelt. Das Infektionsverhältnis entsprach etwa 0,05 KID₅₀ pro Zelle. Nach 0, 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24, 30, 36, 42, 48, 72, und 96 Stunden wurden je 6 Röhrchen zur Bestimmung des Virusgehaltes von Mediumphase, Zellphase (3 Röhrchen) und des Gesamtvirus (3 Röhrchen) ausgewertet. Bis zur Titrierung der Infektiosität wurden die Proben bei -20°C aufbewahrt.

3.1.7. Infektionstechnik und Blutentnahme bei der Maus

Die Infektion erfolgte mit reinem Kulturvirus. In den Versuchen wurden mehrere Applikationsarten angewendet:

- intracerebral (i.cer): Babymäuse im Alter von 9-12 Tagen mit je 0,02 ml Virussuspension mit einer Metallkanüle auf einer Verbindungslinie zwischen den lateralen Augenwinkeln etwas paramedian;
- intraperitoneal (i.p.): Volumina zwischen 0,1 und 1,0 ml, wie üblich;
- intrakutan (i.k.): ca. 0,02 ml mit einer Metallkanüle im Bereich der Schwanzwurzel. Es wurde versucht eine kleine Quaddel zu setzen, wobei nicht das gesamte Volumen intrakutan zu applizieren war. Dabei bildete sich zwar eine Quaddel aus, die sich aber ringförmig um den Schwanz in einer Breite von etwa 1 cm ausbreitete und innerhalb einer Stunde verschwunden war;
- dermal (derm.): nach Skarifikation der Haut im dorsalen Bereich der Schwanzwurzel in Form von 20 Stichen mit

einer Kanüle (0,40x20 mm) wurde Infektionsmaterial (zwischen 0,01 und 0,02 ml) eingegeben;

- subcutan (s.c.): Applikation im Bereich der Kniefalte oder in die Fußsohle der linken Hinterextremität;
- intracardial (i.card.): bei der passiven Immunisierung mit monoklonalen Antikörpern und Immenserum mit einem Volumen von 0,1 ml. Unter Narkose wurde mit einer 0,40 mm starken Kanüle das Herz punktiert und nach Prüfung durch Aspiration von Blut die Inokula langsam appliziert.

Narkose: Ketanest/Rompun im Verhältnis 4:1,
davon etwa 0,05 ml i.p..

Die Wirkung trat nach etwa 2 min ein, es wurde eine gute Narkosetiefe erreicht. Der Nachschlaf betrug zwischen 30 und 60 min.

Blutentnahme aus dem retroorbitalen Venenplexus:

Die Tiere werden im Genick mit Daumen und Zeigefinger einer Hand fixiert. Durch leichtes Anspannen der erfassten Hautfalte wird ein Druck auf die Halsgegend erreicht, die Kopfgefäße werden gestaut und die Bulbi quellen hervor. Das Auge wird mit einem Lokalanästhetikum desensibilisiert. Mit einer Glaskapillare (Heparinized Natelson Capillary Tube, Volumen 0,25 ml) wird in den medialen Augenwinkel eingegangen und die Konjunktiva in kaudo-medialer Richtung durchbohrt (MAYR et al, 1974). Je Maus kann dann zwischen 0,3 und 0,5 ml Blut aus dem retroorbitalen Venenplexus entnommen werden. Blutproben wurden zur Serumgewinnung über Nacht bei 4°C aufbewahrt, anschließend zentrifugiert, das gewonnene Serum 1:10 in PBS verdünnt und 30 min bei 56°C inaktiviert.

Teilweise wurden Tiere nach Äthernarkose durch Herzpunktion auch vollständig entblutet.

3.1.8 Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)

Material:

- 96-Lochplatte, Flachboden;
- Coating Puffer: 0.06M Carbonat/Bicarbonat Puffer, pH 9.6 einstellen;
- NaCl-Phosphat Puffer (NaCl-PP) +0.05 % Tween 20 zur Verdünnung des Serums
- Konjugat: NaCl PP (ohne Tween), 5% FKS + 0.1% Anti-Maus-Immunglobulin vom Kaninchen, Peroxidase-konjugiert.
- Substrat: Orthophenyldiamin 0.01%ig + H_2O_2 0.01%ig in aqua dest.

Durchführung:

(Technik nach HARENNIKOVA et al., 1981)

- I Adsorption des Antigens;
- II Zusatz der Serumverdünnungen;
- III Suchen des Antigen-Antikörperkomplexes unter Benutzung des entsprechenden Antispezies-Immunoperoxidase-Konjugates;
- IV Demonstration der Enzymaktivität mit Hilfe des Substrates.

ad I: Zur Beschichtung der Platten wurde VaV-M1 aus MA-Zellen verwendet. Das Zellkulturvirus wurde in einer Kühlzentrifuge bei 11000 U/min 90 min sedimentiert, das Pellet in Tris-Puffer aufgenommen, mit der gleichen Menge Fluorcarbon gemischt, kurz beschallt und niedertourig abzentrifugiert. Die oberste Phase mit dem gereinigten Virus wurde vorsichtig abgesaugt und nach der Titrierung der Infektiosität zur Plattenbeschichtung eingesetzt.

Die günstigste Virusverdünnung wurde in Vorversuchen ausgetestet, 1:50 in Coating-Puffer vorverdünnt in die Plattenvertiefungen aufgetragen, die Platten über 4 Stunden bei 37°C inkubiert und dann über Nacht im Kühlschrank aufbe-

wahrt. Die beschichteten Platten können bei 4°C mindestens 4 Monate gelagert werden.

ad II: Die beschichteten Platten wurden vor Durchführung des Testes mit Waschlösung mind. 3x gewaschen. Die zu prüfenden Seren wurden auf der Platte in 2-er Schritten verdünnt und 1 Stunde bei 37°C inkubiert.

ad III: Die Platten wurden wiederum mind. 3x gewaschen, mit je 0,1 ml des vorbereiteten Konjugates beschichtet und 30 min wie oben inkubiert.

ad IV: Nach erneutem Waschen wurde je Loch 0,1 ml Substrat zugegeben, die Platte 30 min bei Raumtemperatur stehengelassen, davon ca. 10 min auf einem Mikroschüttler. Nach genau 30 min erfolgt die Ablesung per Photometer bei der Wellenlänge von 450 nm. Werte über 0,1 (Extinktion) wurden als positiv gewertet.

Subklassenbestimmung der MAK:

Serumfreie Überstände (Medium) von MAK-sezernierenden Hybridoma-Zellkulturen wurden 1:2 in Coating-Puffer verdünnt. Die Plattenbeschichtung und der Test wurden analog den oben dargestellten Verfahren durchgeführt.

Die Bestimmung der AK-Subklasse erfolgte mit Immunglobulinen von Kaninchen (Fa. Miles), die gegen IgA, IgE, IgM und IgG 1, 2a und 2b der Maus gerichtet sind. Die Markierung dieser Kaninchenimmunglobuline wird mittels anti-rabbit-Serum von der Ziege geführt.

3.1.9 Serumneutralisationstest

Plaquereduktionstest in der 24-Lochplatte

Er wurde als Plaquereduktionstest (PRT) in Zellkulturen in 24-Loch-Platten angesetzt. Antigen (Virus) und Antikörper (Serumverdünnungen) wurden zusammen inkubiert, Komplement zugesetzt und die Gemische auf Zellen verimpft.

Material:

- VaV-M1-Virussuspension, auf 100 plaquebildende Einheiten (PBE) pro 0,05 ml eingestellt (ca. 400 KID₅₀/0,05 ml);
- Affennierenzellen (MA 104) in 24-Lochplatten am Vortag eingesät (ca. 500000 Zellen/ml), am Testtag zum gerade dichten Monolayer ausgewachsen;
- Kaninchennormalserum (nicht inaktiviert);
- Färbe- und Fixierlösung: Kristallviolettlösung (1%ig) mit Formalin (0,5%).

Durchführung des Plaquereduktionstestes:

Jeder Serumverdünnungsreihe (2er Schritte) wurde das gleiche Volumen an Testvirus zugegeben und die Gemische 2 Stunden bei 37°C inkubiert. Nach Zusatz von Kaninchennormalserum (1:5 vorverdünnt; 10% des Gesamtvolumens) und erneuter Inkubation von einer Stunde bei Raumtemperatur wurden die Neutralisationsgemische auf Zellen verimpft. Das Medium wurde zuvor abgesaugt, die Kulturen 1x mit PBS gewaschen und pro Verdünnungsstufe der Seren 2 Löcher à 0,1ml beimpft. Nach einer Stunde Adsorptionszeit bei 37°C wurden die Zellen erneut mit PBS gewaschen und 1 ml Plaquemedium überschichtet (MEM mit 5% FKS und 1% DMSO).

Vor dem Ablesen der Ergebnisse nach 24 h wurde das Plaquemedium dekantiert, die Färbelösung aufgetragen und nach zwei Minuten die Platten im Wasserbad gewaschen.

Auswertung: Bei jedem PRT wurden ein positives Serum (Maus, PRT-Titer 1:4000), 1:10 verdünnt, und ein negatives Serum (Kaninchennormalserum), 1:2 verdünnt, als Kontrollen mitgeprüft. Die Anzahl der Plaques in den Kulturen der Löcher, beschickt mit dem neg. Kontrollserum-Virus-Gemisch, wurde als Referenzwert herangezogen.

Als positiver Serumtiter wurde die Serumverdünnung gewertet, die eine Reduktion der Plaquanzahl um mindestens 50% gegenüber der Kontrolle bewirkte.

3.1.10 Hämagglutinationshemmungsreaktion mit VaV

Material:

- HBK = Erythrozyten von vorgetesteten Hühnern, 3x gewaschen,
0.5%ig in NaCl-Lösung mit 1% Kaninchennormalserum suspendiert;
- HA-Antigen: VaV-Bern, Verreibung infizierter Chorioallantois-Membranen in PBS, ultrabeschallt, Zentrifugation 20 min bei 2000g, eingestellt auf 4-8 Hämagglutinerende Einheiten (HE).
- 96-Lochplatte mit Rundboden.

Durchführung:

Die HAH-Reaktion wurde im Mikrotest mit zwei Lochreihen je Serum angesetzt. Den Serumverdünnungsreihen (1:2, in NaCl-Lösung; je Loch 0,025 ml) wurden im 2.Schritt je Loch 0,025 ml Antigen zugemischt und nach 1 Stunde Inkubation bei Raumtemperatur im 3.Schritt 0,05 ml HBK-Suspension zugegeben. Abgelesen wurde nach 40-60 min (Raumtemperatur), als positiv (HA gehemmt) gewertet wurden scharf sedimentierte Erythrozytenknöpfe, die bei Schräghalten der Platte deutliche Fließbewegungen zeigten. Jedem Test lief eine Erythrozyten-, eine Virus- (nur Antigen, kein Serum) und 2 Serumkontrollen (Maus, HAH-Titer 1:512 und neg.) parallel.

3.1.11 Technik der monoklonalen Antikörper

a) Immunisierung

Balb-C Mäuse wurden mit reinem VaV-Kulturvirus, Stamm M1, 10^6 KID₅₀, i.p. infiziert und 28 Tage später mit der gleichen Dosis i.p. reinfiziert. Drei Tage nach der Reinfektion wurden die Tiere entblutet und die Milz unter sterilen Kautelen entnommen.

Herstellung von Hybridomazellen:

Nach Standardverfahren (FAZEKAS de ST. GROTH und SCHEIDEGGER, 1980; KÖHLER und MILSTEIN, 1975) wurden Milzzellen der immunisierten Mäuse mit X.63.Ag.8.653-Myelomzellen fusioniert. Die Aufbereitung der Milzzellen, die Vorbereitung der Myelomzellen und die Fusion erfolgte nach den beschriebenen Techniken (CZERNY, 1986). Die fusionierten Zellen wurden in HAT-Medium mit frisch gewonnenen Peritonealmakrophagen als 'feeder cells' aufgenommen, in 24-Loch-Platten (Fa.Flow) ausgesät und bei 37°C unter 5% CO₂-Atmosphäre bebrütet. Nach 12-14 Tagen wurden die Kulturüberstände aus Löchern, in denen Kolonien ausgewachsen waren, im Neutralisationstest, in der HAH-Reaktion und im ELISA auf sezernierte AK untersucht. Kolonien mit seropositivem Ergebnis ihrer Überstände wurden auf 24-Loch Platten zunächst gepickt und gut auswachsende Hybridoma-Linien in Zellkulturflaschen (Fa. Falcon) weiter vermehrt.

Klonierung :

Aus mittelgroßen, gut bewachsenen Kulturflaschen wurden die im Neutralisationstest positiven Hybridoma-Kolonien nach der Limiting dilution-Technik (HÜBERT, 1985) auf die Mikrotiterplatten kloniert. Nicht klonierte Zellen wurden nach Standardverfahren (MAYR et al., 1974) als Reserve eingefroren.

Die Überstände (Medien) aus Zell-Löchern, in denen nur ein Zellklon auswuchs, wurden auf neutralisierende Antikörper untersucht. Die positiven Zellklone wurden vermehrt und zur Produktion von Asciten und 'serumfreien' Überständen herangezogen.

Produktion serumfreier (s.f.) Überstände:

Von 175cm²-Zellkulturflaschen wurde nach Dichtwachsen der Hybridom-Zellen das Medium vollständig abgesaugt, die Zellen mit PBS gewaschen und anschließend mit Dulbecco's MEM ohne FKS überschichtet. Die Überstände (s.f.) wurden nach

4-5 Tagen abgenommen und durch Zentrifugation bei 2000g über 25 min von Detritus und degenerierten Zellen gereinigt.

Produktion von Ascites:

Etwa 10^7 Hybridoma-Kulturzellen wurden in Balb-C Mäuse, denen 10-40 Tage zuvor 1 ml Pristane (2,6,10,14-Tetramethyl-Pentadecan) i.p. verabreicht worden war, injiziert. Nach ca. 10 Tagen konnte nach der Methode von BRODEUR et al. (1984) unter sterilen Kautelen Ascitesflüssigkeit gewonnen werden. Sie wurde 25 min bei 2000g zentrifugiert und anschließend portioniert bei -20°C aufbewahrt.

Reinigung monoklonaler Antikörper:

Um unspezifische Reaktionen im Neutralisationstest und im Elisa ausschließen zu können wurden die AK-haltigen Asziten teils 30 min bei 56°C inaktiviert, teils über die Protein-A-Affinitätschromatographie gereinigt (Methode bei HÜBERT, 1985).

MAK (Subklasse IgG 2a) des MVA-Klones 5B4/2F2 wurden freundlicherweise von Dr. Claus Czerny zur Verfügung gestellt und als serumfreie Überstände, Eluate und Ascites in den Testen vergleichend eingesetzt.

Immunserum von der Maus gegen Influenzavirus Stamm MIAMI (NT Titer 1:4000) und MAK (Subklasse IgG2a) des EHV-Klones 6B11 stammen aus der institutseigenen Sammlung.

3.2. Versuche und Ergebnisse

3.2.1. Vorversuche

a) Auswahl des Zellsystems für den Virusnachweis

Aus dem breiten Spektrum empfänglicher Kulturzellen (vgl. 3.1.2.) war zunächst eine Zellart auszuwählen, der in Bezug auf Handhabung, Reproduzierbarkeit und Sensitivität der Vorzug zum VaV-Nachweis zu geben war.

Mit VaV-M1 der 1. und 2. Babymaus-Neuropassage wurden vergleichend Titrierungen der Infektiosität einmal im Mikrotitertest und zum anderen im Röhrchentest mit 6 Zellarten durchgeführt. Die Ergebnisse sind in den Abbildungen 1 und 2 schematisch dargestellt. Nicht in die Wertung genommen ist die Titrierung in HeLa-Röhrchenkulturen. Ausgewertet wurden die Ergebnisse von jeweils 3 Titrationen.

Die geometrischen Mittel bildeten die Durchschnittswerte. Sie waren im Mikrotiterverfahren und im Röhrchentest jeweils gleich und betrugen $10^{7,0}$ KID₅₀/ml für das VaV-M1 der 1. Gehirnpassage und $10^{7,4}$ KID₅₀/ml für das der 2. Passage. Alle einbezogenen Zellarten waren für das VaV-M1 voll empfänglich. Die Infektiositätstiter differierten nur geringfügig, jedoch nicht biomathematisch signifikant. Bei der Auswertung in MA- und KL-Zellen resultierten jeweils etwas bessere Durchschnittswerte.

Abb. 1: Titervergleich, VaV-M1,1.MP

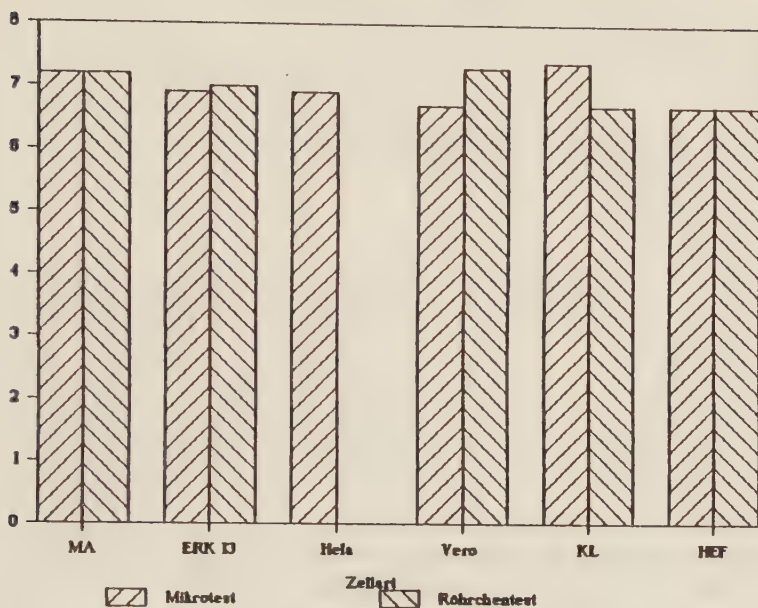
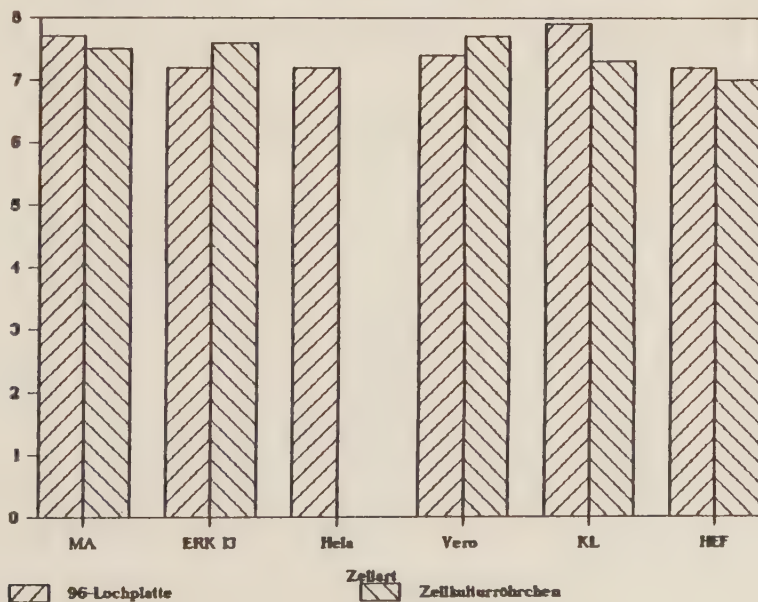


Abb. 2: Titervergleich, VaV-M1, 2.MP



b) Vermehrung in MA-Zellen

Als Nachweissystem für das VaV-M1 wurden MA-Zellen für alle weiteren Versuche ausgewählt. Über die Auswertung einheitlich infizierter Röhrchenkulturen mit MA-Zellen wurde für dieses System eine Vermehrungskurve zur Klärung wesentlicher Kriterien erstellt.

1. günstigster Zeitpunkt der Virusernte, höchste Virusausbeute;
2. Anteil von intrazellulärem und extrazellulärem Virus;
3. günstigster Zeitpunkt zur Ernte von extrazellulärem Virus.

In der Abb. 3 sind die Ergebnisse für die Zellphase (IZV), die Mediumphase (EZV) und das Gesamtvirus (GV), gemessen über den Zeitraum von 96 Stunden schematisch dargestellt. Der Gehalt an IZ- und Gesamt-Virus stieg in den Kulturen 68 Stunden p.i. von einem Grundwert (etwa $10^{2,5}$ KID₅₀/ml) kontinuierlich bis zum Maximum von 10^7 bzw. $10^{7,5}$ KID₅₀/ml an, das nach 42 Stunden erreicht wurde.

In der Mediumphase nahm die Viruskonzentration erst nach 16 Stunden signifikant zu und erreichte ein Maximum bei $10^{5,3}$ KID₅₀/ml nach 48 Stunden. Der Anteil des extrazellulären Virus am Gesamtvirus verblieb über den gesamten Zeitraum bei etwa 1%.

In Abb. 4 ist die parallele Entwicklung des cytopathischen Effektes (cpE) von VaV-M1 in MA-104-Zellen dargestellt. Er wurde etwa 9 Stunden p.i. mikroskopisch erfaßbar, der Zellverband lockerte sich stellenweise leicht auf, nach 11 Stunden zeigen einzelne Zellen bereits Abkugelungsphase, der Kern wird relativ deutlich erkennbar und erste Zellen lösen sich aus dem Zellverband. Nach einer weiteren Stunde heben sich die ersten Zentren mit cpE (Plaques) bereits gegenüber der Umgebung ab. Von diesem Zeitpunkt an entwickelt sich der cpE rasch weiter. 24 Stunden nach der Infektion sind über 50% der Zellen cytopathisch verändert oder lysiert, weitere 12 Stunden später erreicht der cpE 95%.

Abb. 3: Virusvermehrungskurve, VaV-M1

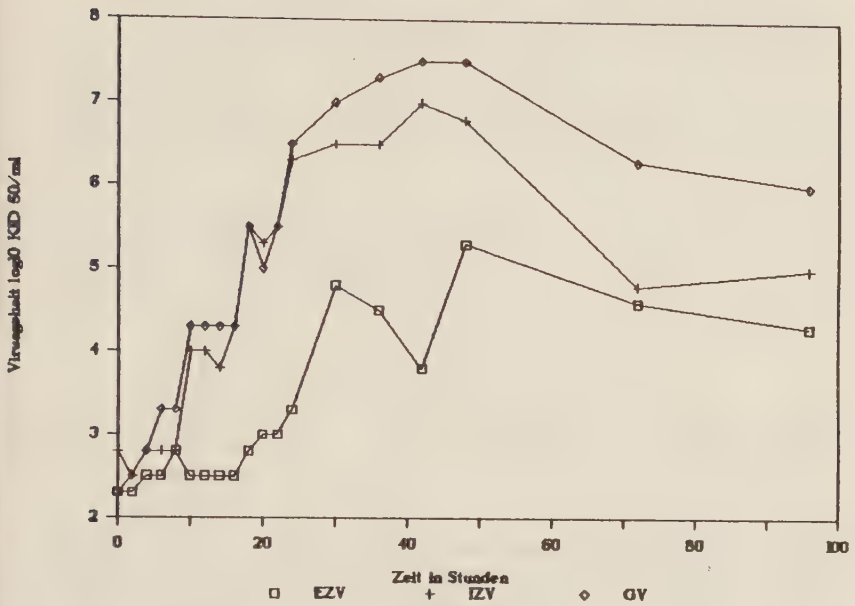
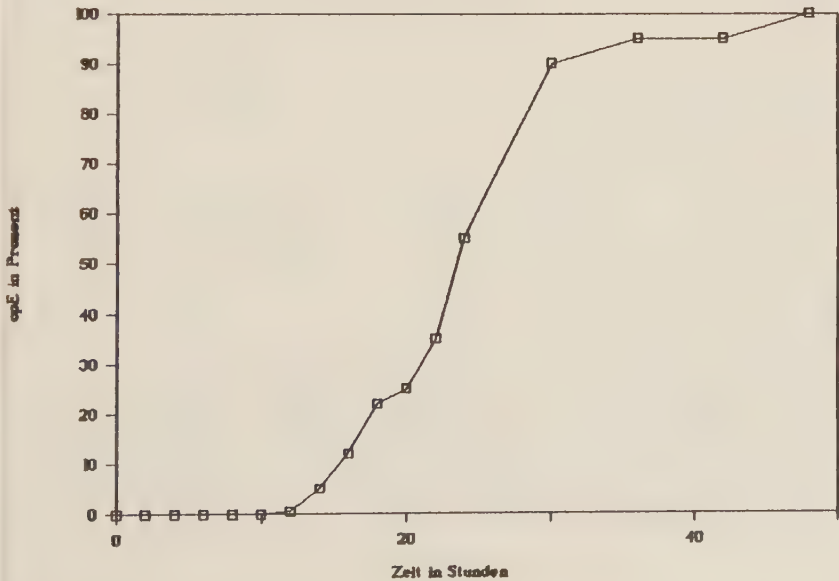


Abbildung 4: Ausbildung des cpE



c) Gewinnung von extrazellulärem Virus (EZV)

Für spezielle Serumneutralisationsteste mußte reines EZV gewonnen werden, das einen Mindesttiter von 10^4 KID₅₀/ml aufwies. MA-Zellen in Penicillinkolben wurden mit VaV-M1, Verhältnis etwa 0,1 KID₅₀/Zelle, infiziert, nach 12 Stunden auf cpE kontrolliert und nur von Flaschen, deren Zellrasen noch intakt war, das Medium abgezogen. Sein Gehalt an EZV lag bei $10^{2,5}$ KID₅₀/ml. Nach dem beschriebenen Verfahren wurde es auf 2ml (Titer $10^{4,8}$ KID₅₀/ml) eingengt und dann im NT eingesetzt.

3.2.2. Ermittlung der Mindestdosis für die Manifestation der VaV-Infektion in der Maus

Ziel dieser Versuche war es, mit für Mäuse gut pathogenen VaV-Stämmen den geeigneten Infektionsweg zu finden, bei dem sich mit einer möglichst niedrigen Infektionsdosis (KID₅₀) an der Maus ein gut diagnostizierbares Krankheitsbild entwickelt.

Anhand der Ergebnisse war eine Modellinfektion (Belastungsinfektion) zu erstellen, die es später erlaubte, an vorbehandelten Mäusen Immunitäten unterschiedlicher Stärke festzuhalten.

a) Intraperitoneale Infektion

Zur Feststellung der ID₅₀ und der LD₅₀ verschiedener VaV-Stämme wurden weibliche, 6-8 Wochen alte Mäuse des Inzuchtstammes NMRI mit den neurovirulenten VaV-Stämmen M1, Hagen und Levaditi infiziert.

Dazu wurde die Infektion zunächst nur mit dem Stamm M1 in abgestuften Verdünnungen durchgeführt. Nachdem für diesen Stamm die Maus-ID₅₀ und die Maus-LD₅₀ bekannt waren, beschränkte sich das weitere Vorgehen auf die Überprüfung der Virulenz der beiden anderen Stämme mit Virusdosen, die im Bereich der LD₅₀ des Stammes M1 lagen.

Zur Überprüfung einer serologisch nachweisbaren Immunität wurden 28 Tage p.i. von den Tieren, welche die Infektion überlebten, Serum gewonnen und im PRT und in der HAH-Reaktion auf Antikörper untersucht. Eine Übersicht der Ergebnisse ist in den Tabellen 1 und 2 dargestellt.

Tabelle 1: Ergebnisse nach der i.p. Infektion empfänglicher NMRI-Mäuse mit VaV-M1

appl. Dosis	Klinik		tödlicher Verlauf		AK-Titer 1:	
	Anzahl*	Typ	Anzahl*	Todestag	PRT	HAH
4,0 b	1/2	1	0/2		640	256
5,0 a	2/2	1	0/2		2560	512
5,0 b	3/3	1	0/3		2560	1028
5,2 a	2/2	1	0/2		1280	512
5,5 a	2/2	m-s	1/2		n.d.	n.d.
6,0 a	4/4	s,g	4/4	5,7,7,11	n.d.	n.d.
6,0 b	1/1	s,r	1/1	8	n.d.	n.d.
6,3 a	1/1	s,i	1/1	8	n.d.	n.d.
6,5 a	2/2	s,i	2/2	6,7	n.d.	n.d.

Tabelle 2: Ergebnisse nach der i.p. Infektion empfänglicher NMRI-Mäuse mit VaV Stamm Hagen (H) und Levaditi (L)

appl. Dosis	Klinik		tödlicher Verlauf		AK-Titer 1:	
	Anzahl*	Typ	Anzahl*	Todestag	PRT	HAH
5,5 L	0/3		0/3		10	20
6,0 L	0/3		0/3		40	20
5,2 H	0/3		0/3		320	80
5,7 H	2/3	1,1	0/3		1280	160
2,5 H	0/18		0/18		siehe im	
4,5 H	0/9		0/9		Immunitäts-	
5,5 H	1/15	1	0/15		versuch	

Erläuterungen zu den Tab.: Dosisangaben in $\log_{10} \text{KID}_{50}$,
Anzahl * = Anzahl der erkrankten bzw. verendeten Tiere/
Anzahl der Tiere im Versuch, n.d.= nicht getestet, Virus:
b= 9.HEF-, 4.M-, a= 9.HEF-, 6.M-, 1.MA-Passage, Erkrankungs-
typ: l=leicht, m=mittel, s=schwer, g=gemischt, r=Lungen-,
i= Intestinal-, k=Augenform

Besprechung: Die Infektion mit VaV-M1 führte bei allen Versuchstiergruppen zu Krankheitserscheinungen. Die Gruppe, die die geringste Dosis erhielt, umfaßte 2 Mäuse. Bei einem Tier war am 5. und 6. Tag p.i. eine leichte Beeinträchtigung des Allgemeinbefindens festzustellen. Das zweite Tier verhielt sich unauffällig. Beim Einsatz höherer Dosen erkrankten regelmäßig sämtliche Tiere einer Gruppe. Eine genauere Beschreibung des klinischen Bildes erfolgt bei 3.2.3.b. Die Titrierung der Virusinfektiosität in Organen verendeter Tiere ergab hohe Virusgehalte in Milz (10^4 - $10^{6,5} \text{KID}_{50}/\text{ml}$) und Leber (10^3 - $10^6 \text{KID}_{50}/\text{ml}$). Die in Gehirn und Lunge festgestellten Werte variierten stark (0 - $10^5 \text{KID}_{50}/\text{ml}$).

Aus den erfassten Werten wurden für VaV-M1 nach der Methode von SPEARMAN und KAERBER die Maus- ID_{50} mit 10^4KID_{50} und die Maus- LD_{50} mit $10^{5,5} \text{KID}_{50}$ berechnet.

In allen überprüften Seren waren neutralisierende und hah Antikörper nachweisbar.

Dagegen zeigten die Mäuse, die mit hohen Dosen ($10^{5,5}$ bzw. 10^6KID_{50}) des Stammes Levaditi infiziert worden waren, keine Krankheitserscheinungen. Die niedrigen AK-Titer belegen zwar eine Auseinandersetzung des Immunsystems mit dem applizierten Virus, können aber auch als ein Indiz für die mäßige Virulenz bzw. schwächere Immunogenität dieses Stammes interpretiert werden, dessen Maus- ID_{50} (über 10^6KID_{50}) und Maus- LD_{50} nicht bestimmt wurden.

Für den Stamm Hagen wurde eine Maus- ID_{50} von etwa $10^{5,6} \text{KID}_{50}$ errechnet. Dabei zeigten nur einzelne Tiere, die $10^{5,9} \text{KID}_{50}$ oder mehr Virus erhalten hatten, klinische Er-

scheinungen, die sich in einer Umfangsvermehrung des Abdomens mit leichter Fluktuation äußerten. Das Allgemeinbefinden war wenig gestört. Die Bestimmung des Virusgehaltes im Ascites, brachte niedrige Werte zwischen 10^2 und 10^3 KID₅₀/ml. Die nachgewiesenen AK-Titer sind aber niedriger als die Werte nach Applikation einer vergleichbaren Dosis des Stammes M1. Die Maus-ID₅₀ des VaV-Hagen wurde mit $10^{5,6}$ berechnet, auf eine Bestimmung der LD₅₀ verzichtet.

Tabelle 3: Vergleich der Mäusevirulenz verschiedener VaV-Stämme nach Infektion empfänglicher NMRI-Mäuse

Virusstamm	ID ₅₀	LD ₅₀
	in log ₁₀ KID ₅₀	
Levaditi	> 6	-
Hagen	5,65	-
M1	4,0	5,5

In weiteren Versuchen wurden zum Vergleich der Empfänglichkeit verschiedener Mäusestämme DBA- und Balb-C-Mäuse mit dem VaV-M1 i.p. infiziert.

Die Ergebnisse sind in den Tabellen 4 und 5 aufgezeichnet.

Tabelle 4: Ergebnisse nach der i.p. Infektion empfänglicher DBA/2-Mäuse mit VaV-M1

appl. Dosis	Klinik		tödlicher Verlauf		AK-Titer 1:	
	Anzahl*	Typ	Anzahl*	Todestag	PRT	HAH
4,0	0/2		0/2		1600	800
4,5	2/2	1	0/2		1600	800
5,0	4/4	s,r	1/4		3200	800
5,5	4/4	s,g,i	4/4	4,4,5,5	n.d.	n.d.
6,0	2/2	s,i	2/2	4,5	n.d.	n.d.
6,5	2/2	s,g	2/2	4,5	n.d.	n.d.

Tabelle 5: Ergebnisse nach der i.p. Infektion empfänglicher Balb-C-Mäuse mit VaV-M1

appl. Dosis	Klinik		tödlicher Verlauf		AK-Titer 1:	
	Anzahl*	Typ	Anzahl*	Todestag	PRT	HAH
4,5	0/2		0/2		2048	256
5,0	2/3	l	0/3		n.d.	n.d.
5,5	2/2	m	0/2		1028	512
5,5	3/3	l	0/3		2048	512
6,0	3/3	l	0/3		800	640
6,0	3/3	l	0/3		3200	640
6,5	2/2	s	0/2		3200	320
6,7	2/2	s,r	2/2	7	n.d.	n.d.
6,9	2/2	s,g	2/2	8,9	n.d.	n.d.

Erläuterungen: Dosisangaben in $\log_{10}$ KID₅₀, Anzahl*= Anzahl der erkrankten bzw. verendeten Tiere/ Anzahl der Tiere im Versuch, n.d.= nicht getestet, Erkrankungstyp: l=leicht, m=mittel, s=schwer, g=gemischt, r=Lungen-, i= Intestinal-, k=Augenform

Der Verlauf der Erkrankung (Auftreten der ersten Symptome, Rekonvaleszenzdauer, bzw. Todestag) und die nach der Infektion auftretenden Krankheitserscheinungen waren bei den drei Mäusestämmen sehr ähnlich. Auch der Virusgehalt in den Organen variierte innerhalb der drei Stämme nur wenig. In ihrer Empfänglichkeit gegenüber dem VaV verhielten sich die drei Stämme dagegen nicht einheitlich. Die Ergebnisse zeigten für NMRI-Mäuse und DBA/2-Mäuse gegenüber dem Balb-C-Stamm signifikant geringere LD₅₀- und ID₅₀-Werte (vgl. Tab. 6).

Tabelle 6: Vergleich der Empfänglichkeit verschiedener Mäusestämme gegenüber dem VaV-M1

Mäusestamm	ID ₅₀	LD ₅₀
	in log ₁₀	KID ₅₀
NMRI	4,0	5,5
DBA/2	4,25	5,125
Balb-C	4,9	6,6

b) Subkutane Infektion

Die sub- und die intrakutane Infektion wurde nur mit dem virulenten VaV-M1 in verschiedenen Dosierungen durchgeführt. Sie sollte einen Vergleich der Pathogenese bei verschiedenen Applikationsarten unter dem Bild einer lokalen Infektion mit Entwicklung von makroskopisch diagnostizierbaren Pockeneffloreszenzen ermöglichen.

Die Ergebnisse der s.c. Infektion sind in Tabelle 7, die Ergebnisse der i.k. Impfung in Tabelle 8 dargestellt.

Tabelle 7: Ergebnisse nach der s.c. Infektion empfänglicher NMRI-Mäuse mit VaV-M1

appl. Dosis	Klinik		tödlicher Verlauf		AK-Titer 1:	
	Anzahl*	Typ	Anzahl*	Todestag	PRT	HAH
4,0	0/2		0/2		128	32
5,5	1/2	s	0/2		1280	512
6,0	2/3	m	0/3		1280	512

Erläuterungen: Dosisangaben in log₁₀ KID₅₀, Anzahl*= Anzahl der erkrankten bzw. verendeten Tiere/ Anzahl der Tiere im Versuch, Erkrankungstyp: m=mittel, s=schwer

c) Intrakutane Infektion

Tabelle 8: Ergebnisse nach der i.k. Infektion mit VaV-M1

Tiere	Dosis	Krankheitserscheinungen	AK-Titer 1:	
			PRT	HAH
2 a	2,0	1/2 leichte Rötung und Schwellung	640	160
2 a	3,0	1/2 Pusteln ab d 6	2560	160
4 a	4,0	4/4 Pusteln ab d 4 Abheilung ab d 20	640	320
2 a	4,0	2/2 Pusteln ab Tag 4, 1 Tier starke Nekrose	3200 2560	200 320
2 a	4,5	2/2 starke Erscheinungen ab d 4	2560	320
5 a	5,0	5/5 Pusteln ab d 4 Abheilung ab d 19	800 640	320 320
3 a	5,1	3/3 sehr starke Erscheinungen	2560	320
2 b	2,0	2/2 ab d 6, frühe Abheilung ab d 12	160	80
2 b	3,0	1/2 ab d 5, mittel	160	160
2 b	4,0	2/2 starke Erscheinungen ab d 5	320	320

Dosis in $\log_{10}$ KID₅₀

Tiere: NMRI-Stamm, 6-10 Wochen alt = a

DBA/2 Stamm, 8 Wochen alt = b, weiblich

Besprechung: Die Reaktionen nach dermalen und intrakutaner Applikation des VaV-M1 unterschieden sich in verschiedenen Parametern (ID₅₀, Krankheitserscheinungen u. a.) kaum voneinander. Die Ergebnisse sind deshalb auch gemeinsam tabellarisch aufgezeichnet. Schwierigkeiten ergaben sich aber nach der dermalen Applikation durch die recht umfangreiche Traumatisierung bei der Infizierung, die es z.T. sehr

schwierig machte, Erscheinungen als Folge der Skarifizierung von denen der spezifischen Infektion zu trennen. Dem intrakutanen Infektionsweg wurde deshalb fortan der Vorzug gegeben.

Bei der subkutanen Applikation traten nur bei einem Tier (NMRI, $10^{5,5}$ KID₅₀) deutliche Allgemeinerscheinungen auf. Immer jedoch war bei erkrankten Tieren eine deutliche Schwellung und Schmerzhaftigkeit an der Injektionsstelle zu erkennen, jedoch keine Pockenbildung an dieser oder anderen Stellen.

Tab. 9 faßt die Ergebnisse im Vergleich zusammen.

Tabelle 9: Dosis-Vergleich nach verschiedenen Applikationsarten nach der VaV-M1-Infektion

Applikationsart	ID ₅₀ in log ₁₀	LD ₅₀ in KID ₅₀
intrakutan	2,5	-
intraperitoneal	4,0	5,5
subkutan	5,7	> 6

Die Krankheitserscheinungen nach intrakutaner und nach intraperitonealer Infektion sind in 3.2.3 genau beschrieben. Die Immunantwort der infizierten Tiere, die Über eine Reinfektion sowie die Bestimmung der AK-Titer nachgewiesen wurde, war in ihrer Intensität bei den verschiedenen Applikationsarten vergleichbar.

3.2.3. Klinisches Bild der VaV-Modellinfektion unter definierten Bedingungen

a) Klinisches Bild nach intrakutaner Infektion

VaV des Stammes M1, Virusgehalt $10^{5,7}$ KID₅₀/ml, wurde empfänglichen Mäusen intrakutan am Schwanzansatz in einer Menge von etwa 0,02 ml appliziert. Erscheinungen: Am Tage nach der Infizierung war der Bereich der Injektionsstelle gerötet, was als leichte Entzündung, hervorgerufen durch die Injektion, interpretiert wurde. Am 3. und 4. Tag nach der Infizierung begann eine spezifische Reaktion, die sich anfangs als leichte Rötung und Schwellung äußerte, im Verlauf der Infektion an Intensität zunahm und meist ab Tag 5 durch die Bildung von einzelnen bis mehreren Pusteln charakterisiert war (Abb.5). Diese Pusteln öffneten sich 1-2 Tage später, es kam zur Ausbildung von nässenden, offenen, ulcerierenden Stellen (Pocken), welche nach mehreren Tagen dann durch Schorfbildung abgedeckt wurden. Die Schwellung und Rötung war in diesem Stadium erheblich (Abb.6). Bei dem Tier der Abb.7 führte die massive Entzündung des gesamten Schwanzbereiches sogar zur Nekrose und zum Verlust der Schwanzspitze 40 Tage p. i.. Die Abheilung der betroffenen Stellen erfolgte dann relativ schnell. Die Wundschorfe fielen etwa 20-25 Tage

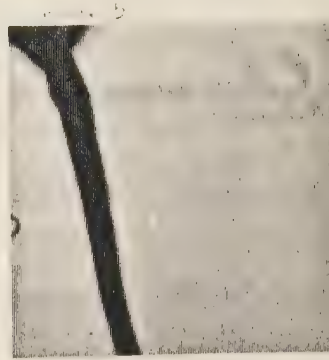


Abb. 6

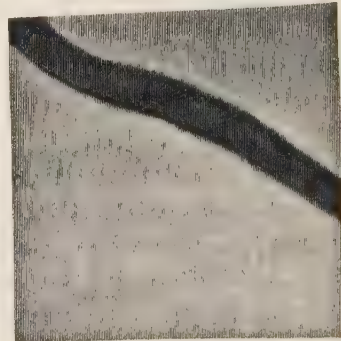
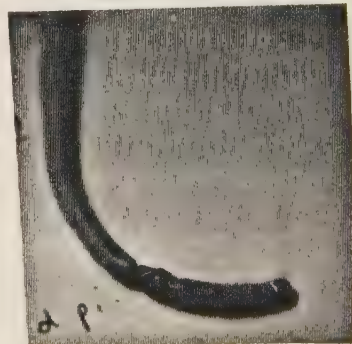


Abb. 7



nach der Infektion ab, es wurde Narbengewebe, charakterisiert durch eine dunklere Färbung und eine sehr glatte und haarlose Oberfläche, sichtbar.

Eine Störung des Allgemeinbefindens wurde nach der intrakutanen Applikation bei keinem der infizierten Tiere beobachtet, der Aufbau der Immunität und die festgestellten Antikörper-Titer waren mit der nach i.p. Infektion vergleichbar. Bei 2 Tieren wurde am Tage 8 p.i. versucht, aus den Hauteffloreszenzen Virus zu isolieren. Der Nachweis gelang sowohl über das Elektronenmikroskop wie auch durch Verimpfung auf MA-Zellen.

Challenge-Infektionen zur Immunitätsüberprüfung wurden nach dieser Methode mit 10^4 KID₅₀ VaV-M1 durchgeführt.

b) Klinisches Bild nach intraperitonealer Infektion

Empfängliche, nicht vorbehandelte Mäuse wurden i.p. mit verschiedenen Virusdosen infiziert. Dabei waren folgende Erscheinungen zu beobachten:

Beim Überschreiten der ID₅₀ kam es, in Abhängigkeit von der Höhe der applizierten Dosis, zwischen Tag 3 und Tag 5 p.i. zum Auftreten erster Krankheitserscheinungen. Sie äußerten sich in einer Verschlechterung des Allgemeinbefindens. Die Tiere waren weniger aufmerksam bis apathisch, zeigten verminderte Futter- und Wasseraufnahme und gesträubtes Haarkleid. Bei Dosen, die die ID₅₀ nur wenig überschritten, waren ansonsten keine Erscheinungen zu beobachten und wenige Tage später verbesserte sich das Allgemeinbefinden. Die Rekonvaleszenz war nach 14 Tagen abgeschlossen. Wurden VaV-Dosen etwas unter oder über der LD₅₀ verabreicht, folgte eine dramatische Entwicklung. Allgemeinererscheinungen traten meist schon ab Tag 3 p.i. auf. Zusätzlich zu den beschriebenen waren respiratorische (R), konjunktivale (K) und intestinale (I) Symptome zu beobachten. Dabei zeigten Mäuse mit respiratorischen Symptomen eine stark erhöhte Atemfrequenz mit deutlicher Unterstützung der Ex- und Inspiration und wiesen einen hohen

Virusgehalt im Lungengewebe auf.

Symptome an den Augen äußerten sich in einer ausgeprägten Konjunktivitis, z.T. mit Verklebung der Augenlider und in einer ausgesprochenen Lichtscheue.

Bei den intestinalen Symptomen stand eine Veränderung des Kotes zu breiligen, weichen Massen im Vordergrund. In manchen Fällen kam es zur deutlichen Umfangsvermehrung des Abdomens mit Ascitesbildung, in welchem ebenso wie in Milz und Leber ein hoher Virusgehalt gemessen wurde.

Die unterschiedlichen Symptomengruppen traten zum Teil einzeln, z.T. auch gemeinsam auf. Zwischen Tag 4 und Tag 11 p.i. verendeten die infizierten Tiere; Überlebten sie diesen Zeitraum, kam es zu einer raschen Rekonvaleszenz. Die Verbesserung des Allgemeinzustandes dauerte etwa 8 Tage; 21 Tage p. i. war der Ausgangszustand wieder erreicht.

Zur Challengeinfektion wurde die vierfache LD_{50} von VaV-M1 eingesetzt.

3.2.4. Prüfung des Infektionsmodelles

Ziel dieser Versuche war es zu überprüfen, ob sich die i.k. oder die i.p. Modellinfektion als Challenge für die Überprüfung eines Immunstatus eignen. Dazu wurden zum einen Mäuse, die eine massive Infektion mit VaV-M1 überlebt hatten und hohe Antikörpertiter aufwiesen, 35 Tage nach dieser Erstinfektion, zum anderen Mäuse mit unterschiedlicher Immunisierungsvorgeschichte zu verschiedenen Zeitpunkten, einer Challengeinfektion unterzogen.

a) Belastungsinfektion von Tieren mit einer ausgeprägten Pockenimmunität

Um abzuklären, welchen Einfluß eine Immunität auf den Krankheitsverlauf nach einer Reinfektion

(Belastungsinfektion) nimmt, wurden immune Mäuse verschiedener Stämme 35 Tage nach der Erstinfektion reinfiziert. Diese Tiere waren in den Infektionsversuchen

(vgl. 3.2.2.) einer unterschiedlich starken i.p. Infektion mit VaV-M1 unterzogen worden. 28 Tage nach der Erstinfektion wurde von ihnen Serum gewonnen und im PRT und in der HAH-Reaktion auf neutralisierende und hah Antikörper untersucht. Am 35. Tag wurden sie mit VaV-M1 i.k. (Dosis 10^4 KID₅₀) oder i.p. (4 LD₅₀) reinfiziert. Tabelle 10 gibt eine Übersicht über diese Prüfungen.

Tab. 10: Aufstellung der in der Belastungsinfektion eingesetzten vorbehandelten Tiere

Mäuse- stamm	An- zahl	Dosis ^a	AK-Titer 1:		Challenge- infektion
			PRT	HAH	
DBA	3	5,0	3200	800	i.k. 10^4 KID ₅₀
	2	4,0	1600	800	i.k. "
NMRI	3	5,2	1280	512	i.k. "
	4	5,0	2560	1028	i.k. "
Balb/C	3	5,5	1028	512	i.k. "
NMRI	3	4,0	2560	1028	i.p. 4 LD ₅₀
Balb/C	3	6,5	1028	512	i.p. 4 LD ₅₀

^a: Infektionsdosis in log₁₀ KID₅₀

Besprechung: Nach i.p. Reinfektion waren bei keinem der Tiere Krankheitserscheinungen zu beobachten, das Allgemeinbefinden nicht gestört.

Am Tag 1 oder 2 nach der i.k. Reinfektion reagierten alle Mäuse mit einer leichten unspezifischen Läsion im Bereich der Injektionsstelle. Spezifische Reaktionen traten nicht ein. Die vorhandene Immunität schützte die Tiere vor einer erneuten Erkrankung nach der zweiten Infektion.

b) Belastungsinfektion von aktiv mit VaV-Hagen (Neurovaccinia) immunisierten Tieren

Eine Challengeinfektion wurde hier an Mäusen mit unterschiedlichem Immunstatus p.i. durchgeführt. Dazu wurden 6-8 Wochen alte NMRI-Mäuse mit VaV-Hagen aktiv immunisiert.

3 Versuchstiergruppen erhielten unterschiedliche Virusdosen i.p.; Gruppe A eine Dosis von $10^{5,5}$ KID₅₀ VaV-Hagen, also etwas weniger als eine Maus-ID₅₀; Gruppe B $10^{4,5}$ KID₅₀ und Gruppe C $10^{2,5}$ KID₅₀. Letztere Dosis wurde für kleiner als die Immunisierungs-Mindestdosis vermutet.

In Sammelserum aller Tiere, das vor Versuchsbeginn gewonnen wurde, waren keine neutralisierenden und hah Antikörper gegen Pocken nachzuweisen.

An den Tagen 3, 7, 10, 14 und 21 nach der Immunisierung wurde von je 3 Mäusen jeder Gruppe Blut zur Serumgewinnung entnommen und diese Tiere mit VaV-M1 (i.k., 10^4 KID₅₀/Tier) reinfiziert. Die gewonnenen Seren wurden im PRT und in der HAH-Reaktion untersucht, um über die Bestimmung der Antikörpertiter die Entwicklung einer Immunität parallel verfolgen zu können.

Reaktion auf die Belastungs- (Challenge-) Infektion

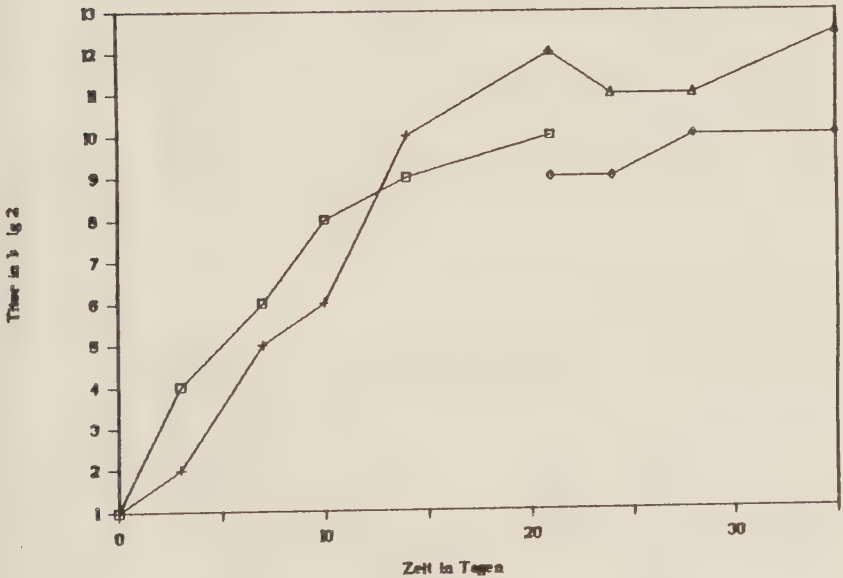
Gruppe A: Bei Tieren, die am 3. bzw. am 7. Tag reinfiziert worden waren, entwickelte sich innerhalb der ersten 24 Stunden nach der Challengeinfektion (p.ch.) an der Injektionsstelle im Bereich der Schwanzwurzel eine leichte Rötung und Schwellung, die am 4. Tag p.ch. abklang. Wurde die Challenge-Infektion nach dem 7. Tag durchgeführt, erschien nur noch teilweise eine leichte Rötung und Schwellung am Tag 1 und 2 p.ch., was als zellvermittelte Hypersensibilität gegen VaV bzw. als unspezifische Reaktion auf das Injektionstrauma interpretiert werden kann. Eine Pustel- und Pockenbildung wurde nicht beobachtet.

Die Antikörperentwicklung, im PRT und in der HAH-Reaktion ermittelt, ist in Abb.8 dargestellt. Ein Anstieg der hah Antikörper war bereits nach 3 Tagen nachweisbar (etwa doppelter Ausgangs- oder Nullwert), das Maximum wurde am Tag 21 mit einem Titer von 1:1024 erreicht; die neutralisierenden Antikörper stiegen erst am Tag 7 an, auch hier wurde das Maximum mit einem Titer von 1:4096 am Tag 21 nachgewiesen.

Gruppe B: Sie umfaßte 9 Tiere, die an den Tagen 3, 7 und 14 der Challenge-Infektion unterzogen wurden. Bei den am 3. Tag testinfizierten Tieren trat eine starke Schwellung und Rötung des Schwanzes auf, zwei Tiere entwickelten Pocken am 8. Tag, bei einem dritten ging die Schwellung ab Tag 6 zurück.

Nach der Reinfektion am 7. Tag war bei allen 3 Mäusen eine leichte Rötung und Schwellung im Schwanzwurzelbereich an den Tagen 1-4 erkennbar; diese geringgradigen Lokalreaktionen klangen bei den Tieren, die am 14. Tag reinfiziert worden waren, schon nach 2 Tagen wieder ab. Die Antikörpertiter sind mit denen der Gruppe A vergleichbar.

Abb. 8: Antikörpertiter, zeitl. Verlauf



□ hah AK p.imm.

♦ neutr. AK p.imm.

♦ hah AK p.imm. und ch.

* neutr. AK p.imm. und ch.

Gruppe C: Alle Mäuse dieser Gruppe zeigten nach der Belastungsinfektion das typische Erkrankungsbild unbehandelter, bzw. nicht immuner Tiere. Neutralisierende oder hah Antikörper konnten bei ihnen bis zum 14.Tag p.i. im Serum nicht nachgewiesen werden. Aus diesem Grund wurden sechs Mäuse dieser Gruppe am Tag 14 nochmals mit VaV-Hagen ($10^{2,5}$ KID₅₀ i.p.) reinfiziert und 7 bzw. 14 Tage nach dieser zweiten Immunisierung der Challenge-Infektion unterzogen.

Hier waren, entsprechend dem unterschiedlichen Status zur Zeit der Challengeinfektion, unterschiedliche Reaktionen auf die Belastungsinfektionen ablesbar. Während 3 Tage nach der Zweitimmunisierung noch keine Modifizierung des Krankheitsverlaufes p.ch. zu erkennen war, verlief die Reaktion der 7 Tage p.i. testinfizierten Tiere bereits abgeschwächt. Weitere 3 Tage später war die Immunität soweit entwickelt, daß Krankheitserscheinungen weitgehend ausblieben. Die für die Gruppe C bei der Erstinfektion applizierte Virusdosis erwies sich als zu gering für die Stimulierung einer belastbaren Immunität.

Tabelle 11 zeigt eine Übersicht dieser Versuche.

Tabelle 11: Übersicht über die Reaktion auf die Belastungsinfektion bei aktiv immunisierten Tieren

Gruppe	Vorbehandlung: +aktive Immun- isierung mit	Belastungsinfektion:			Grad
		Tag nach Vor- behandlung	Anzahl*	Klinik	
A 1	5,5	3	3/3		+
A 2	5,5	7	3/3		+
A 3	5,5	10	0/3		-
A 4	5,5	14	0/3		-
A 5	5,5	21	0/3		-
B 1	4,5	3	3/3		++/+++
B 2	4,5	7	3/3		+
B 3	4,5	14	0/3		-
C 1	2,5	3	3/3		+++
C 2	2,5	7	3/3		+++
C 3	2,5	10	3/3		+++
C 4	2-malig 2,5	21	3/3		+++
C 5	2-malig 2,5	28	3/3		+++

Erläuterungen: + aktive Immunisierung mit VaV-Hagen; angegeben ist die Infektionsdosis in $\log_{10}$ KID₅₀; Belastungsinfektion mit VaV-M1, i.k., Dosis 10^4 KID₅₀/Tier; klinische Erscheinungen (Anzahl der erkrankten Tiere/Gesamtanzahl) der Versuchstiere; Grad: - keine Krankheitserscheinungen, + leichte Rötung und Schwellung bis Tag 4, ++ mittlere Rötung und Schwellung, +++ massive Erscheinungen mit Pustel- und Pockenbildung.

c) Belastungsinfektion bei paramunisierten Mäusen:

Um zu klären, ob die beobachteten Immunitätsreaktionen, a) und b), nur durch die spezifische Immunisierung mit VaV oder aber ev. auch nach einer allgemeinen Stimulierung des Immunsystems, durch eine Paramunität, erreicht werden kann, wurde an drei Gruppen à 3 Mäuse (NMRI-Stamm, weiblich, 6-8 Wochen alt), je 1,0 ml des Paramunitätsinducers PIND-AVI (Ch.-Nr 158, 640 Wirkungseinheiten, Titer vor der Inaktivierung $>10^{7,0}$ KID₅₀) verabreicht.

Nach 3, 7 bzw. 14 Tagen wurde je eine Gruppe der i.k. Belastungsinfektion unterzogen.

Die Tiere zeigten Krankheitserscheinungen, wie sie aus den Versuchen mit unbehandelten, voll empfänglichen Mäusen bekannt waren. Die Vorbehandlung mit Paramunitätsinducern hatte keinen Einfluß auf den Ablauf des spezifischen Infektionsgeschehens (Challenge).

d) Belastungsinfektion bei passiv immunisierten Tieren:

Abschließend wurde die Challenge-Infektion an mit anti-VaV-Immunserum bzw. mit anti-VaV-MAK passiv immunisierten Mäusen durchgeführt. Diese Versuche und ihre Ergebnisse werden in Abschnitt 3.2.6. beschrieben.

3.2.5. Herstellung und Prüfung monoklonaler Antikörper

a) Herstellung von monoklonalen Antikörpern

Milzzellen von mit VaV-M1 immunisierten Mäusen wurden mit X.63.Ag.8.653 Myelomzellen fusioniert (Beschreibung u.a. in 3.1.13).

Drei solche Fusionen wurden durchgeführt. Die Zellsuspension jeder Fusion wurde auf vier 24-Lochplatten verteilt. Nach 10 Tagen waren in etwa 90% der Löcher eine oder mehrere Kolonien gewachsen. Die Koloniezahl je Fusion betrug etwa 200. Zwischen Tag 10 und 14 wurden die Überstände der kolonienhaltigen Plattenvertiefungen mit den verschiedenen Nachweisverfahren (screening tests) auf Antikörper untersucht, dabei für ELISA und PRT 1:2, für die HAH-Reaktion 1:10 vorverdünnt.

Hah Antikörper konnten in den Zellkulturüberständen nicht nachgewiesen werden.

Im ELISA reagierten von 160 getesteten Überständen 75 positiv (Extinktion über 0.1), davon wurden sieben Kolonien mit einer Überstand-Extinktion über 0.5 ausgewählt. Die Zellen wurden vermehrt und in flüssigem Stickstoff eingefroren. Bei der späteren Überprüfung im ELISA war in zwei Überständen keine Aktivität mehr feststellbar, in einem nicht erwünschte Aktivität auch gegen MA-Zellkulturmaterial vorhanden und vier erneut positiv gegen VaV-M1-Gesamtvirus mit Titern zwischen 1:128 bis 1:1024.

In 4 Überständen aus den Kolonien IC5 und IIA2 der 1.Fusion, IB3 der 2.Fusion und ID6 der 3.Fusion ließen sich im PRT neutralisierende Antikörper nachweisen. Diese einzelnen Kolonien wurden gepickt, nach Dichtwachsen erneut geprüft und dann von IB3 vier Kolonien und von ID6 eine Kolonie als positiv ausgewählt.

Die positiven Kolonien wurden weiter vermehrt und dann nach dem limiting-dilution-Verfahren kloniert. In etwa 50% der Näpfe wuchsen 1 oder mehrere Kolonien.

Ca. 50% der Überstände von Klonen aus IB3/1.Fusion reagierten im PRT positiv, von 54 getesteten Überständen der Klonierung aus ID6/2.Fusion nur zwei Klone. 10 Klone wurden isoliert und die Zellen als Reserve in flüssigem Stickstoff eingefroren.

b) Charakterisierung der MAK

Von den verfügbaren Klonen mit Sekretion neutralisierender MAK wurden 5 ausgewählt, die Hybridomzellen dieser Klone weiter vermehrt und zur Produktion von serumfreien (s.f.) Zellkulturüberständen und Ascitesflüssigkeit (vgl. 3.1.13) herangezogen. Zur Charakterisierung der MAK wurden s.f. Überstand und Ascitesflüssigkeit dieser Klone 25 min bei 2000g zentrifugiert, Ascites weiterhin teils 30 min bei 56°C inaktiviert, teils über die Protein-A-Affinitätschromatographie gereinigt und in den Untersuchungen eingesetzt.

I) Bestimmung der Immunglobulinsubklassen der MAK

Die Klassen- und Subklassenbestimmung erfolgte im direkten ELISA. Mikro-ELISA-Platten wurden mit gereinigten serumfreien Überständen der MAK-sezernierenden Klone beschichtet (vgl. 3.1.9.). In der Tabelle 12 sind die Ergebnisse dieser Untersuchungen zusammengefaßt.

Tabelle 12: Absorbtionseinheiten aus dem ELISA zur Bestimmung der Immunglobulinsubklassen von MAK gegen VaV-M1 (angegeben sind die Extinktionen der 1:10 Verdünnungen)

Antiserum	Monoklonale Antikörper (Klone)				
	IB3/E11	IB3/C11	IB3/A11	IB3/G2	ID6/F10
IgA	0,137	0,185	0,142	0,310	0,137
IgM	0,043	0,054	0,039	0,080	0,117
IgG 1	0,295	0,482	0,578	0,375	0,303
IgG 2a	1,406	1,875	1,577	1,623	1,219
IgG 2b	0,382	0,451	0,359	0,343	0,377
IgG 3	0,207	0,203	0,314	0,182	0,171

Aus den Werten läßt sich schließen, daß alle untersuchten MAK der Immunglobulinsubklasse IgG 2a angehören.

II) Vergleich der monoklonalen Antikörper im ELISA

Zur weiteren Charakterisierung der MAK wurden serumfreie Überstände, Eluate der Protein-A-Affinitätschromatographie und inaktivierte Asciten der 5 Klone im ELISA auf mit VaV-MVA und VaV-M1 beschichteten Platten getestet. In Tabelle 13 sind die ermittelten Endpunkttiter aufgezeichnet.

Tab. 13: Endpunkttiter der MAK im ELISA (1:)

MAK -Material		Prüfung gegen	
		VaV-MVA	VaV-M1
A 11	s.f.Übstd.	80	40
	Ascites	2×10^5	2×10^5
	Eluat	640	n.d.
C 11	s.f.Übstd.	80	20
	Ascites	10^5	5×10^4
	Eluat	320	n.d.
E 11	s.f.Übstd.	40	20
	Ascites	2×10^5	2×10^5
	Eluat	1000	n.d.
G 2	s.f.Übstd.	160	< 10
	Ascites	10^5	640
	Eluat	160	< 100
F10	s.f.Übstd.	40	20
	Ascites	10^5	2×10^5
	Eluat	1000	320
5B4/2F2	s.f.Übstd.	2048	320
	Ascites	n.d.	n.d.
	Eluat	n.d.	2×10^5

n.d. = nicht durchgeführt. Der Titer ist als reziproke Zahl der Endverdünnung angegeben.

Die MAK der verschiedenen Klone verhielten sich weitgehend ähnlich. Die Endpunkttiter der s.f. Überstände lagen zwischen 1:20-1:40 im Plattentest gegen VaV-M1 bzw. 1:40-1:160 gegen VaV-MVA. Für Eluate wurden Titer zwischen 1:160-1:1000, für inaktivierte Mäuseasciten zwischen $1:10^5$ - $1:2 \times 10^5$ bestimmt.

Nur die MAK des Hybridomaklones IB3/G2 reagierten gegen VaV-M1 etwas schwächer. Die Titer auf VaV-MVA beschichteten Platten lagen insgesamt etwas höher, was auf eine stärkere Antigen-Beschichtung hinweist. MAK des MVA-Klones 5B4/2F2 erreichten sehr viel höhere Werte.

Parallel wurden zur Abgrenzung unspezifischer Reaktionen inaktivierte Asciten und s.f. Überstände auch auf unbeschichteten und auf mit MA-Zellkulturprotein beschichteten ELISA-Platten geprüft. Die Titer lagen für Asciten unter 1:200 und für s.f. Überstände unter 1:10.

III) Vergleich der MAK im Neutralisationstest:

Die ausgewählten MAK wurden im PRT zuerst gegen VaV-M1-Kulturvirus getestet, das als Gesamtvirus IZV und EZV enthielt und auf 100 PBE/0,05 ml eingestellt war. Untersucht wurden von jedem Klon s.f. Überstand, Eluat und inaktivierte Ascitesflüssigkeit und jeweils die Plaque-reduktionsendtitert bestimmt. In Abbildung 9 sind die Ergebnisse für Asciten und Eluate der Klone, in Abbildung 10 die für die s.f. Überstände dargestellt.

Abb. 9: MAK im PRT gegen GV

Titer 1:1000

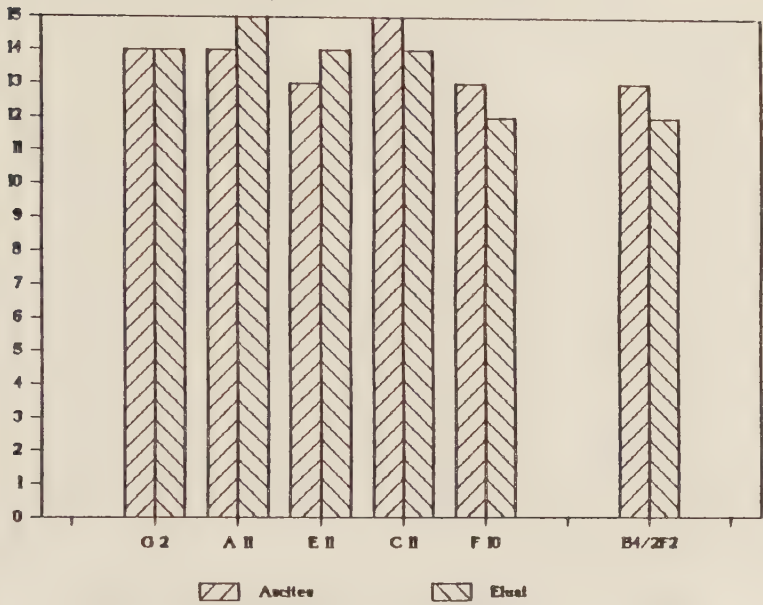
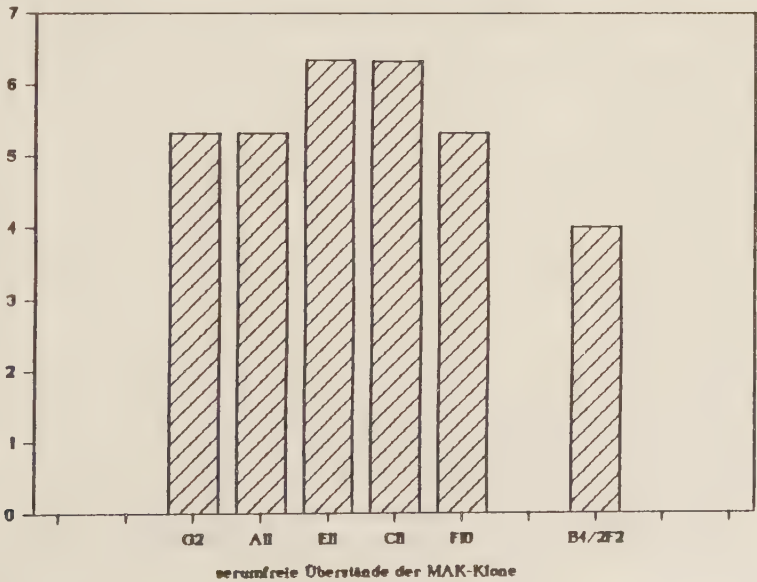


Abb. 10: MAK im PRT gegen GV

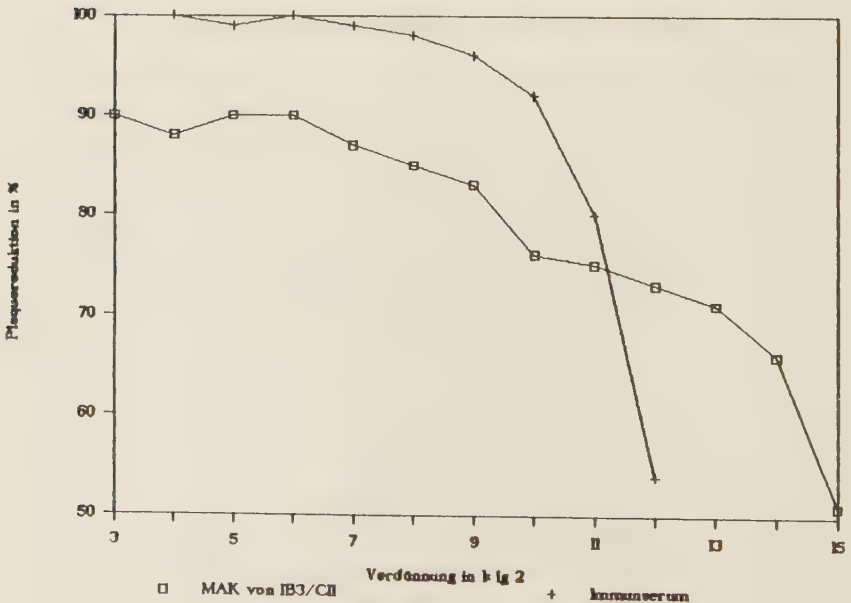
Titer 1:1000



Besprechung: Wie im ELISA verhielten sich die MAK der 5 Klone auch im PRT weitgehend ähnlich. Die Titer, für s.f. Überstände 1:40-1:80, für Asciten und Eluate 1:8000-1:32000, differierten zwischen den verschiedenen MAK nur um eine, höchstens zwei Verdünnungsstufen, begründet vermutlich im unterschiedlichen Proteingehalt der Suspensionen. Bemerkenswert dagegen fiel der Vergleich der Kurven aus der Plaquereduktion zwischen Immunseren und MAK aus!

Abb. 11 stellt den Verlauf halblogarithmisch dar. Es wurden die Werte eines Immunserums und der inaktivierten Ascitesflüssigkeit des Zellklones IB3/C11, Titer 1:32000, ausgewählt, beide für die jeweilige Gruppe typisch im Verlauf. Das Immunserum wurde von einer Balb-C-Maus gewonnen, die zweimal im Abstand von 4 Wochen mit VaV-M1 (Dosis 10^6 KID_{50}) immunisiert und anschließend zur Gewinnung von Milzzellen getötet worden war. Es wies im PRT einen Titer von 1:4000 auf.

Abb. 11: Vergleich der Plaquereduktion



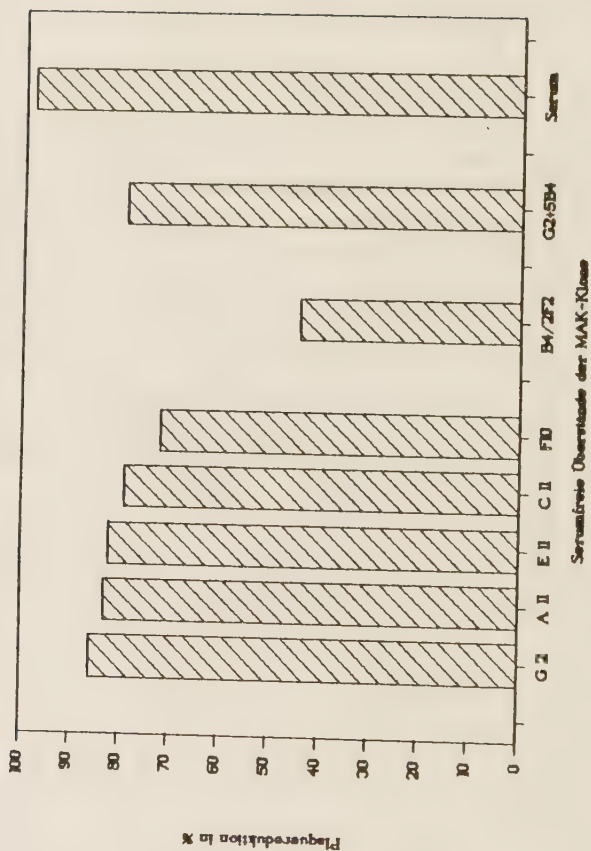
Bei schwacher Verdünnung der Immunseren betrug die Plaque-reduktion fast immer 100%. Diese vollständige Reduktion blieb bis zu Verdünnungen von 1:250-1:500 erhalten. Danach fielen die Werte steil und etwa linear ab.

Die MAK dagegen erzielten auch bei niedrigen Verdünnungen nur eine Reduktion der Plaqueanzahl um etwa 90%. Diese Werte fielen bis zum Endpunkt allmählich und kontinuierlich ab.

Um abzuklären, ob es sich bei der durch die MAK nicht neutralisierbaren Restinfektiosität von etwa 10% des eingesetzten Gesamtvirusmaterials um EZV handelte, wurden die MAK anschließend im PRT gegen extrazelluläres Virus getestet. Hierfür wurden s.f. Überstände der MAK-se-zernierenden Klone in der Verdünnung von 1:2 verwendet. Abb. 12 gibt die Ergebnisse dieser Untersuchung wieder. Das Immunserum, 1:10 vorverdünnt, blieb mit einer Plaque-reduktion von 98% auch hier überlegen. Die Reduktion um 72-85% durch MAK der anti-VaV-M1-Klone zeigte aber, daß diese MAK auch EZV neutralisieren. Ein Gemisch der s.f. Überstände des Klones IB3/G2 und des MVA-Klones 5B4/2F2 lag mit einer PR von 79% ebenfalls in diesem Bereich.

MAK des MVA-Klones 5B4/2F2 dagegen erreichten nur eine Reduktion der Plaqueanzahl um 44%, ein Ergebnis, das eine klare Aussage über die Neutralisation von EZV nicht erlaubt.

Abb. 12: MAK im PRT gegen EZV



3.2.6. Schutzteste mit monoklonalen Antikörpern

In diesem Abschnitt sollte untersucht werden, ob eine passive Immunisierung von Mäusen mit anti-VaV-Immunserum oder anti-VaV-MAK die zur Prüfung einer Pockenimmunität der Maus entwickelte (vgl. 3.2.3.) und definierte Belastungsinfektion mit VaV-M1 beeinflusst. Anti-OPV-MAK wurden Balb-C Mäusen verabreicht und die Tiere anschließend VaV-M1 testinfiziert.

a) Intrakutane Belastungsinfektion

An je 3 Balb-C-Mäuse wurden inaktivierte Asciten (1:10 verdünnt, VaV-M1-Klon G2 und VaV-MVA-Klon 5B4/2F2) in der Menge von 0,2 ml/Tier, an Kontrolltiere je 0,2 ml eines anti-VaV-Immunserums bzw. PBS i.p. verabreicht.

Am darauffolgenden Tage wurden alle Tiere der intrakutanen Challenge-Infektion mit VaV-M1 (Dosis 10^4 KID₅₀) unterzogen.

Alle 12 Tiere erkrankten typisch, wie bei unbehandelten Tieren beschrieben. Ein passiv durch MAK erreichter Schutzeffekt war gegenüber der homologen kutanen Infektion nicht erkennbar.

b) Intraperitoneale Belastungsinfektion

Mit MAK der VaV-M1-Klone G2, A11 und des MVA-Klones 5B4/2F2, getrennt und als Gemisch, wurden männliche Balb-C Mäuse, 6-8 Wochen alt, intracardial mit 0,1 ml der 1:10 verdünnten, über die Protein-A-Säule gereinigten Eluate aus Asciten behandelt. Der Ausgangstitel der Eluate im NT betrug 1:32000.

Zusätzlich erhielten 3 Tiere je 0,1 ml inaktiviertes anti-VaV-Immunserum, das im PRT einen Titer von 1:4000 aufwies. Kontrolltieren wurde PBS (2 Mäuse), bzw. inaktiviertes anti-Influenzavirus-Immunserum (3 Tiere, unverdünnt) sowie MAK gegen equines Herpesvirus 1 (3 Tiere, Protein-A-ge-

reinigte Eluate des Zellklones 6B11, neutralisierende MAK IgG 2a, 1:10 verdünnt) verabreicht.

Am darauffolgenden Tag wurde die Tiere mit VaV-M1 (Dosis $10^{7,2}$ KID₅₀ = ca. 4 LD₅₀ bzw. 200 ID₅₀) i.p. testinfiziert. Tabelle 14 zeigt eine Übersicht der Ergebnisse:

Verlauf des Schutztestes:

Von den mit MAK geschützten Tieren starb keines im Verlaufe des Infektionsversuches. Zwei Tiere der Gruppe, die mit dem MVA-MAK geschützt wurden, zeigten am 2.-4.Tag eine leichte Beeinträchtigung des Allgemeinbefindens. Bei zwei von 10 Tieren aus den mit M1-MAK geschützten Gruppen war an Tag 3 bzw. 4 p.i. ebenfalls eine leichte Störung des Allgemeinbefindens zu beobachten.

Mäuse, die mit Pockenimmunserum bzw. mit dem MAK-Gemisch geschützt worden waren, waren nicht beeinträchtigt.

Die Kontrolltiere starben dagegen mit einer Ausnahme an der Infektion. 3-4 Tage nach der Infizierung traten schwere Erscheinungen auf, wie sie in 3.2.3.b beschrieben sind, und die Tiere starben im Verlauf von 11 Tagen.

Aus den Ergebnissen ist eine deutliche Schutzwirkung der passiven Immunisierung auf die nachfolgende Belastungsinfektion abzulesen.

Tabelle 14: Ergebnisse des Schutzversuches mit anti-VaV-Immunsrum und anti-VaV-MAK nach der Belastungsinfektion mit VaV-M1

Vorbehandlung:			Belastungsinfektion ⁺ :		
Anzahl der Tiere	passive Immunisierung mit:	Kontrollen Appl. von:	Klinik Anzahl*	Grad	tödlicher Verlauf Anzahl* Tag p.i.
7	IB3/G2	-	1/7	leicht	0/7
3	IB3/A11	-	1/3	leicht	0/3
3	5B4/2F2	-	2/3	leicht	0/3
3	MAK-Gemisch	-	0/3	-	0/3
3	M1-Immunsrum	-	0/3	-	0/3
3	-	Influenza-anti-Serum	3/3	massiv	3/3 7, 10, 11
3	-	anti-EHV-MAX	3/3	massiv	2/3 6, 7
3	-	PBS	2/2	massiv	2/2 6, 7

Erläuterungen: + Belastungsinfektion mit VaV-M1 i.p. mit 4Maus-LD₅₀

* klinische Erscheinungen (Anzahl der erkrankten Tiere/Gesamtanzahl) und Letalität (Anzahl der toten Tiere/Gesamtanzahl)

4. Besprechung der Ergebnisse:

In einem ersten Versuchsabschnitt galt es, die für die Aufgabenstellung notwendigen virologischen Ausgangsbedingungen zu erarbeiten, sowie eine Methodik für Teste festzulegen. Für die Titrierung der Virusinfektiosität erwies sich der Mikrotest gegenüber dem Röhrchentest als gleichwertig und war arbeitstechnisch vorzuziehen. Als Nachweissystem wurde die MA-Zelllinie als optimal empfänglich mit rasch eintretendem cpE für alle VaV-Stämme ausgewählt.

Auch extrazelluläres VaV und Gesamtvirus ließ sich von den MA-Zellen in ausreichender Menge ernten. Für die Produktion größerer Mengen an EZV wären jedoch Kulturzellen vorzuziehen, die einen größeren Anteil EZV in das Medium eluieren, z.B. RK₁₃-Zellen mit über 20% EZV-Anteil (PAYNE, 1979). Anhand der Vermehrungskurve empfahlen sich 42 Stunden p.i. als Erntezeitpunkt für IZV und GV. EZV wurde 11-13 Stunden nach der Infektion der Zellkulturen bei noch intaktem Zellrasen gewonnen, wenngleich die maximale Ernte erst 15 Stunden p.i. oder später zu erwarten ist (MOSS, 1974).

Der frühe Entnahmezeitpunkt bot eine sichere Abgrenzung zum IZV, das bereits wenig später durch die einsetzende Lysis der Zellen in das extrazelluläre Kulturmedium freigesetzt wird.

Vom Zusatz eines Anti-IZV-Serums zum Zellkulturmedium zur selektiven Bindung von nicht erwünschtem IZV wurde abgesehen, da nicht abzusehen war, inwieweit auch EZV gebunden oder so verändert wird, daß es dem Angriff von gegen EZV gerichteten Antikörpern anschließend nicht mehr zugänglich ist (DUNLAP und BARKER, 1973).

Der langsame Anstieg der Viruskonzentration im Medium war nach einem schwachen Virus-Zellinfektionsverhältnis zu erwarten. Nach der Primärinfektion weniger Zellen wird neu-synthetisiertes EZV zunächst zur sekundären Infektion der restlichen Kulturzellen verbraucht. Erst nach etwa 18

Stunden wird dann vermehrt EZV freigesetzt und nachweisbar. So blieb der EZV-Anteil im eigenen System bei der Ernte nach 11-13 Stunden bei nur 1%.

Der zweite Versuchsabschnitt hatte die Erstellung des Mäuse-VaV-Infektionsmodells zum Ziel.

Im Vergleich der bekannt mäusepathogenen VaV-Stämme M1, Hagen und Levaditi zeichnete sich der Stamm M1 klar als der virulentere und immunologisch wirksamere ab. Er wurde deshalb für die Prüfung des Infektionsmodells ausgewählt. Zwar wurden nur Morbidität und Letalität nach intraperitonealer Applikationsart verglichen; aufgrund der Hinweise aus dem Schrifttum lassen sich die Ergebnisse jedoch auch für andere Infektionsrouten anwenden. Die ID_{50} lag für den Stamm M1 im eigenen Test nach intradermaler Infektion bei $10^{2,5}$ KID₅₀. Für den Stamm Levaditi ermittelte BRIODY (1959) eine Dosis von $10^3 - 10^{4,8}$ PFU, die bei der Hälfte der Versuchsmäuse Hautläsionen hervorrief. Für eine Sero-konversion bei 50% der infizierten Tiere benötigte er sowohl bei der intradermalen als auch bei der intranasalen Virusapplikation eine noch höhere Dosis. Anhand der eigenen, sehr eingeschränkten Versuche einen Vergleich zu den von BRIODY genannten ID_{50} -Werten mit dem Stamm Levaditi zu ziehen, ist nicht möglich. Die eigenen Meßwerte sollten aber im von BRIODY angegebenen Bereich liegen.

Von Versuchen, die Mäusevirulenz des VaV durch mehrere Gehirnpassagen zu erhöhen, wurde mit Ausnahme des Stammes M1 abgesehen, obwohl entsprechende Hinweise aus eigenem Hause vorlagen (PAWLAS, J., 1985, persönl. Mitteilung). Signifikante Unterschiede zwischen Virus der 2. und einer 6. Mäusehirnpassage traten nicht hervor. Offenbar genügt eine kurze Adaptierung für das VaV. Auch LINK et al. (1965) empfehlen die Adaptierung des VaV auf einem hochempfindlichen System vor dem Einsatz in Tierversuchen. Sie führten zu diesem Zweck ein oder zwei Viruspassagen in Mäusegehirnen durch.

Der eigene Vergleich der Empfänglichkeit verschiedener Mäuseinzuchtstämme gegenüber VaV bestätigte die in der Literatur beschriebenen Stammesunterschiede (BRIODY, 1959; AMES, 1962; DIXON et al., 1982), deren Ursache unbekannt ist. LINK et al. (1964) konnten nachweisen, daß die unterschiedliche Empfänglichkeit nicht durch Interferon bedingt ist. Balb-C Mäuse, die aufgrund ihrer ausgeprägten Immunantwort bevorzugt für Immunisierungsversuche und zur Herstellung von monoklonalen Antikörpern verwendet werden, blieben am wenigsten empfänglich, der NMRI-Stamm am meisten. DBA/2 Mäuse, die als 'intermediate responders' (BYRNE et al., 1983), als immunreaktiv intermediärer Stamm gelten, lagen auch in ihrer Empfänglichkeit gegen VaV zwischen den genannten anderen Stämmen. Der Krankheitsverlauf war nach der i.d. und nach der i.p. VaV-Applikation bei den verschiedenen Stämmen gleich. Den Ausschlag für die Verwendung von Balb-C und NMRI-Mäusen für das eigene Modell gab allein die problemlose Beschaffung.

Zur Frage, welcher Infektionsweg bei der Maus für das Modell einer Belastungsinfektion in Bezug auf die Prüfung unterschiedlich ausgebildeter Immunitäten am zweckmäßigsten ist, gibt das Schrifttum nur wenige Hinweise.

Der natürliche Infektionsweg geht bei der Maus über die Aufnahme der Pockenviren über den Respirationstrakt mit Staub und Aerosolen oder über Hautläsionen, wie Bißverletzungen oder andere Defekte (BRIODY, 1959; MAHNEL, 1986). Diesem Weg am nächsten kommen die i.n. und die i.d. Applikation des Virus. Die gut kontrollierbare intradermale Applikation ist vor allem bei größeren Versuchstieren mittels einer Impfkannüle, der Schnittimpfung und dem Auftragen des Impfmateri als auf skarifizierte Hautflächen geeignet und beschrieben (MAHNEL, 1960; BOULTER, 1969; BOULTER et al., 1971). Es kommt zu einer lokalen Vermehrung des VaV und zur Ausbildung von Hautpocken. Einzelne Viren wandern über den Lymphweg in die Blutbahn und vermehren sich in den primär affinen Organen, eine komplexe Immunität wird aus-

gebildet. Die Vorteile dieser Impfmethode liegen in der guten Ablesbarkeit der Reaktion. Nachteile beim Versuchstier Maus sind die geringen applizierbaren Impfvolumina, die eine gewisse Ungenauigkeit in sich bergen.

Für die intranasale Applikation bei Mäusen sind die Aerosolimpfung und die Ablagerung eines oder mehrerer Tropfen in die Nasenöffnung beschrieben worden (MUNZ et al., 1976; LINK et al., 1965). Aufgrund der Ungenauigkeit bezüglich Infektionsdosis und der immer unklaren Reaktion kommt dieser Weg für eine Belastungsinfektion nicht in Betracht. Die intracerebrale Impfung, von verschiedenen Autoren zur Immunitätsüberprüfung durchgeführt (SVET-MOLDAVSKAYA und MATSEVICH, 1969; CHERNOS et al., 1975), stellt einen unnatürlichen Infektionsweg dar. Unklar sind daneben die Beziehungen zwischen einer vorhandenen Immunität und der Virusvermehrung im Gehirn. MORISHIMA und HAYASHI (1978) vermuten, daß das Gehirn von systemischen Immunphänomenen getrennt bleibt und eine eigene immunologische Domäne darstellt.

Die i.m. und die s.c. Infektion erfordern gegenüber dem i.p. oder dem i.v. Weg eine höhere Virusdosis. In den eigenen Versuchen ließ sich dies bestätigen. Die klinischen Erscheinungen auf eine solche Challenge-Infektion bestehen, wie bei der i.p. oder der i.v. Applikation, bei vielen VaV-Stämmen nur in schwer abstufbaren Allgemeinreaktionen, Hautpocken werden nur selten beobachtet. Für bestimmte Fragestellungen ist jedoch die intraperitoneale Belastungsinfektion wertvoll. Die Technik ist auch bei der Maus problemlos und das Inokulum kann in einem gut handhabbaren Volumen genau dosiert werden. Der i.p. Infektion folgte eine sehr einheitliche Reaktion, ID_{50} und LD_{50} ließen sich exakt festlegen. Wurden diese Dosen überschritten, kam es regelmäßig zur Erkrankung bzw. zum Tod aller infizierten Tiere auch bei kleiner Versuchsgruppe.

Als Modellinfektionen zur Prüfung von Immunitäten bei Mäusen bieten sich aufgrund der eigenen Ergebnisse die

intrakutane bzw. intradermale und auch die intraperitoneale Virusapplikation an. Erstere erscheint nur für die Prüfung einer komplexen systemischen Immunität empfehlenswert, wogegen letztere sowohl zur Überprüfung einer systemischen als auch einer humoralen Immunität eingesetzt werden kann, wobei die VaV-Challenge-Dosis niedrig gehalten werden und die vierfache Maus-LD₅₀ bzw. die 200-fache ID₅₀ nicht überschreiten sollte.

Die Testinfektion mit 50 bis zu 10 000 LD₅₀, wie sie von verschiedenen Autoren durchgeführt wurde, erlaubt nur die Überprüfung einer soliden Immunität, zumal bekannt ist, daß auch eine gute Immunität durch eine hohe Infektionsdosis durchbrochen werden kann (MAHHEL, 1960). Die i.p. Infektion gibt also i.d.R. nur eine JA oder NEIN-Antwort.

In den meisten Fällen sollte jedoch der intrakutanen Belastungsinfektion wegen der differenzierteren Folgereaktion der Vorzug gegeben werden. Bei etwa 30 ID₅₀ lag die geeignete Dosierung. Sie eignet sich für die Beurteilung sowohl einer vorhandenen Gewebe- (Haut-) als auch einer komplexen Immunität. Nur eine genaue Beobachtung und der Vergleich des Infektionsbildes bei vorbehandelten mit dem Bild bei voll empfänglichen Tieren (Kontrollen) erlaubte die Unterteilung in empfängliche, teilimmune und immune Tiere anhand der Impfreaktion.

In den Versuchen zur Prüfung des Infektionsmodells wurde dies deutlich. 3 Gruppen von Mäusen wurden mit unterschiedlichen, fallenden Dosen des VaV-Stamm Hagen immunisiert und dann zu verschiedenen Zeitpunkten der i.d. Challengeinfektion unterzogen. Tiere der 3. Gruppe blieben über den gesamten Versuchszeitraum von 28 Tagen empfänglich, sie reagierten wie die Kontrollen auf die Challengeinfektion. Die ihnen inokulierte Virusdosis hatte nicht zur Induktion einer Immunantwort ausgereicht. Abstufungen in der Reaktion auf den Hautchallengetest ließen sich dagegen bei den Tieren der beiden anderen Gruppen erkennen. Die Gewebimmunität war am 10.Tag ausreichend ausgebildet. Es ent-

wickelte sich nur noch eine leichte Rötung und Schwellung am 1. und 2. Tag nach der Challengeinfektion, das Bild einer soliden Immunität.

Mäuse, die mit ca. $0,1 \text{ ID}_{50}$ immunisiert worden waren, entwickelten 3 Tage später auf die Challenge-Infektion das Vollbild der Erkrankung. 7 Tage nach der Impfung reichte die Immunität bereits aus, die Bildung von Hautpocken zu verhindern. Eine vermutlich virusbedingte Rötung und Schwellung von Tag 1-4 p.ch. im Bereich der Injektionsstelle konnte nicht unterdrückt werden. Diese milde und stark beschleunigte Reaktion auf eine i.d. Challenge-Infektion ist als Nachweis einer Teilimmunität seit Jahrzehnten beschrieben. Bei Tieren, die mit ca. 1 KID_{50} immunisiert worden waren, resultierte dieses Bild bereits drei Tage p.imm. als Challengeantwort.

Die in eigenen Testen erkennbare, zum Aufbau der Hautimmunität nach einer Impfung mit VaV nötige Zeitspanne stimmt mit Berichten von HUTT (1975,b) und HOCHSTEIN-MINTZEL et al. (1967) überein, die ein Ingangkommen von spezifischen Immunmechanismen bereits Stunden bis wenige Tage nach Antigenzufuhr und den Nachweis einer Hautimmunität nach dem 8.Tag beschrieben. Der Nachweis von spezifischen Antikörpern gelingt erst ab dem 7.Tag, das Maximum der virusneutralisierenden AK wird etwa 28 Tage nach der Infektion erreicht (HUTT, 1975,a).

Die i.d. Challengeinfektion eignete sich, wie erwähnt, nur zur Überprüfung einer komplexen Immunität, wie sie durch die Infektion mit vermehrungsfähigem Virus induziert wird. Nur die Hautimmunität, eine zellulär begründete Immunität, kann die Pockenbildung verhindern, bzw. abmildern oder beschleunigen. Für die Überprüfung einer rein humoral gestützten Immunität sollte die i.p. Challengeinfektion gewählt werden. Die Ergebnisse der passiven Immunisierung mit Anti-VaV-Immunserum und -MAK machte die Notwendigkeit der zweiten, der i.p. Möglichkeit der Immunitätsüberprüfung deutlich.

Passiv immunisierte Tiere mit einer rein humoral begründeten Immunität reagierten auf die i.k. Testinfektion immer mit Ausbildung von Hautpocken. Diese Tiere überlebten aber die i.p. Infektion mit letalen VaV-Dosen. Durch die Übertragung von Immunserum oder MAK kann also die Vermehrung und Ausbreitung im Organismus des i.p. inokulierten VaV soweit gehemmt werden, daß es entweder nicht zum Ausbruch von Krankheitssymptomen oder nur zu einem wesentlich mildereren Krankheitsverlauf kommt. Aus der geringen Tierzahl lassen sich Unterschiede in der Schutzwirkung nur vermuten. Tiere, die mit polyklonalem Immunserum behandelt worden waren, zeigten p.ch. keine Krankheitserscheinungen, wogegen mit MAK passiv immunisierte Tiere z.T. leicht erkrankten. Dabei schienen die anti-VaV-M1-MAK etwas wirkungsvoller zu sein als die des anti-VaV-MVA-Klones.

Nicht zu beurteilen ist, ob AK mit Aktivität nur gegen IZV ebenfalls in der Lage sind, die Erkrankung nach dem Challengetest zu unterdrücken. Eine Interpretation des schwächeren Schutzes im Modellversuch nach der Applikation von MAK des VaV-MVA-Klones 5B4/2F2 gegenüber MAK von VaV-M1-Klonen erscheint in diesem Sinne möglich.

MAK von 5B4 (MVA-Klon) erreichten im PRT gegen EZV nur eine Plaquereduktion von weniger als 50%, wogegen MAK von M1-Klonen eine Reduktion der Plaqueanzahl um 72-86% bewirkten, also eindeutig auch extrazelluläres Virus neutralisierten. Zwar teilt HUTT (1975,a) den Antikörpern gegen EZV die Hauptwertigkeit beim Schutz gegen die Virusausbreitung im Organismus zu, da aber auch die Ausbreitung von Zelle zu Zelle bekannt ist, und vor allem bei der Zytolyse IZV in erheblichem Umfang frei wird, erklärt nur die Aktivität gegen beide Virusarten den guten Schutz der passiven Immunisierung. Eine weitere grundlegende Schwierigkeit, die relative Bedeutung von zellulären und humoralen Anteilen der Immunität gegen OPV einzuschätzen, besteht darin, die beiden Mechanismen voneinander zu trennen (HUTT, 1975,a). So ist auch die Schutzwirkung einer passiven Immunisierung

mit Rekonvaleszentenserum, Gammaglobulinen oder MAK gegen die Challengeinfektion kein Beweis für eine überragende Bedeutung der humoralen Immunität. Insgesamt stellt sich aber der nachgewiesene Schutzeffekt der MAK im Infektionsmodell erfolgsversprechend dar und könnte eine Basis für das Antidiotyp-Antikörpermodell liefern.

Bei der Herstellung, Gewinnung und Auswahl der für passive Immunisierungsversuche benötigten MAK erwies sich die richtige Wahl der Screening-Teste als wichtig. Nur die exakte Zielsetzung führte zum Auffinden der gewünschten AK-Aktivitäten. Als Screeningteste wurden der Nachweis neutralisierender AK im PRT und der Nachweis virusbindender AK im ELISA gewählt. Die Annahme, daß Überstände von Kolonien, die neutralisierende AK produzieren, auch im ELISA positiv sein müßten, wurde zumindest in den Suchtesten widerlegt. Zellkulturüberstände der Kolonien IB3 aus der 1.Fusion und ID6 aus der 2.Fusion, die im PRT positiv reagierten, zeigten im Screening-ELISA nur Extinktionswerte von 0.07 bzw. 0.057, wurden also in diesem Nachweisverfahren als negativ bewertet. Auch die Auswahl von 5 bzw. 10 isolierten Klonen mit neutralisierender Aktivität aus der Gesamtanzahl der positiven Klone, die sich in den Suchtesten unterschiedlich verhielten, mit dem Ziel verschiedene MAK zu erhalten, zeigte die Probleme auf, die bei der Prüfung sehr inhomogener Gruppen auftreten können. Die Überstände solcher Kulturen können sehr unterschiedliche Mengen an AK, teilweise auch Antikörper von verschiedenen, produzierenden Kolonien oder solchen, die ihre Produktion eingestellt haben, und verschiedene Stoffwechselprodukte enthalten. Als Selektionskriterien wurden die Ergebnisse des im Anschluß an die Klonierung durchgeführten PRT und ELISA herangezogen und Klone mit unterschiedlicher Aktivität ausgewählt.

In den zur Charakterisierung durchgeführten Testen reagierten die MAK der 5 Zellklone weitgehend gleich. Nur im ELISA gegen VaV-M1 zeigten MAK des Klones IB3/G2 eine deut-

lich geringere Aktivität, ein Ergebnis, dessen Ursache nicht geklärt werden konnte. Die geringen Unterschiede in den verschiedenen Nachweisverfahren dürften vor allem durch die unterschiedliche AK-Produktivität der Klone, die sich auch in unterschiedlichen Proteingehalten der Suspensionen ausdrückte, begründet sein. Die Zuordnung aller 5 charakterisierten MAK zur Immunglobulinsubklasse IgG 2a und die angesprochenen Ergebnisse in den Nachweisverfahren führten zu der Annahme, daß die 5 Klone dieselben MAK produzieren, bzw. diese MAK dasselbe Epitop des VaV erkennen. Diese immunogene Determinante ist sowohl dem IZV als auch dem EZV eigen und dürfte in der Virushülle lokalisiert sein. Der in eigenen Versuchen festgestellte Verlauf der Plaque-reduktion war für Immunseren und MAK unterschiedlich und weist auf weitere, noch nicht geklärte Effekte hin. Immunseren, in niedrigen Verdünnungstufen eingesetzt, erreichten im PRT gegen IZV und EZV eine Reduktion der Plaqueanzahl von annähernd 100%, bei zugesetzten 100 PBE bildeten sich keine oder wenige Plaques. In PRT-Testen mit MAK verblieb dagegen stets eine relativ hohe Anzahl an nicht neutralisierbaren Viruseinheiten, die sich in einer Plaqueanzahl von 5-15% (-25%) ausdrückte. Da es sich dabei nicht, wie oben beschrieben wurde, um nicht neutralisierte IZV- oder EZV-Anteile handeln kann, bleibt als Erklärung dieser Effekte nur das Zusammenwirken vieler verschiedener Antikörper im Immunserum (RODRIGUEZ et al., 1985), welches auch dann eine Neutralisation ermöglicht, wenn die von den MAK erkannten neutralisierenden Epitope zufällig nicht besetzt oder dem Angriff auf irgendeine Weise entzogen werden. Synergistische Effekte, wie RODRIGUEZ et al. (1985) sie für ihre MAK nachweisen konnten, wurden nicht beobachtet. Die gemeinsame Verwendung von MAK der VaV-M1-Klone und MAK des VaV-MVA-Klones 5B4/2F2, der eindeutig als von den ersten verschieden charakterisiert wurde, brachte im Neutralisationstest nur ein intermediäres Ergebnis. Der Nachweis, ob die MAK im PRT nur bei Zusatz von Komplement wirksam

sind, wie HISHIMURA et al. (1968) beschrieben, wurde nicht durchgeführt.

5. Zusammenfassung:

Für die Maus wurde eine Modellinfektion zur Überprüfung einer Immunität gegen Orthopockenvirus experimentell erarbeitet. Für eine Belastungsinfektion wurden die intraperitoneale und die intradermale Testinfektion und der Vacciniavirusstamm M1 gewählt. Das klinische Bild nach der intradermalen Applikation von ca. 10^4 KID₅₀ und nach intraperitonealer Applikation verschiedener Dosen des Vacciniavirus M1 an empfängliche Mäuse wurde als Vergleichsgrundlage für die gleichen Infektionen von teilimmunen oder immunen Tieren beschrieben. Anschließend wurde die Eignung dieser Modellinfektionen an Mäusen, die mit vermehrungsfähigem Vacciniavirus immunisiert und solchen, die passiv mit anti-Vaccinia-Immunserum und mit anti-Vaccinia-MAK mit neutralisierender Aktivität behandelt worden waren, überprüft.

Die Herstellung der MAK und ihre Auswahl sowie Charakterisierung mittels ELISA und Neutralisationstest gegen Gesamtvirus und extrazelluläres Virus werden beschrieben. MAK von 5 Zellklonen aus 2 Fusionen verhielten sich weitgehend gleich, gehörten derselben IgG-Subklasse an und dürften gleiche Epitope am Vacciniavirus erkennen. MAK aus Mäuse-Asciten und Eluate der Protein-A-Chromatographie dieser Asciten erreichten im Plaquereduktionstest gegen Vaccinia-Gesamtvirus Titer von 1:8000 bis 1:32000. Serumfreie Kulturüberstände der MAK-Zellklone waren im Plaquereduktionstest bis zu Verdünnungen von 1:40 bis 1:80 wirksam. Gegen extrazelluläres Vacciniavirus reduzierten sie in der Verdünnung 1:2 im Plaquetest zu 72 bis 86 %.

Die MAK erwiesen ihre Aktivität auch im ELISA gegen Vacciniavirus der Stämme M1 und HVA. Als inaktivierte Asciten und Eluate erreichten sie Titer zwischen 10^4 bis 2×10^5 , als serumfreie Überstände solche zwischen 2×10^2 bis 5×10^3 .

Aufgrund der Ergebnisse können für das Infektionsbelastungsmodell je nach Fragestellung zwei Varianten im

Infektionsweg, die intradermale oder die intraperitoneale Infektion mit definierten Virusdosen, empfohlen werden. Mäuse, die passiv mit anti-Vaccinia-Immunserum oder mit hochspezifischen MAK immunisiert worden waren, also über eine nur humoral begründete Immunität verfügten, überlebten die intraperitoneale Testinfektion mit 4 LD₅₀. Im Hautchallengetest erwiesen sie sich jedoch als voll empfänglich. Mit vermehrungsfähigem Vacciniavirus immunisierte Tiere dagegen antworteten sowohl nach intraperitonealer als auch nach intrakutaner Testinfektion mit Immunreaktionen.

6. Summary:

Experiments to examine immunity to orthopoxvirus

An infection model was developed for challenging mice immunized against vaccinia virus.

For challenge infection the intradermal and the intraperitoneal challenge with the strain M1 appeared to be most suitable.

Signs of disease were listed after intradermal inoculation of about 10^4 KID₅₀ and the intraperitoneal inoculation of different doses of strain M1 to mice susceptible to infection in order to have a basis for comparison to the challenge infection in immune mice.

In order to assess the suitability of these model infections of mice, the immunity produced by live vaccinia virus and by application of anti-vaccinia immune sera or neutralizing anti-vaccinia mabs was then tested by both intradermal and intraperitoneal challenge.

The production of mabs, their selection and characterization by ELISA and neutralisation test against extracellular and total virus harvest are described.

Mabs from two different fusions showed similar results and belonged to the same class of immune globulines which lead to the assumption, that all mabs recognize the same epitope of vaccinia virus. Titers in PRA against total harvest of vaccinia virus ranged from 1:8000 - 1:32000 for inactivated ascites fluid containing these mab's and eluats of protein A chromatography. In the assay against extracellular virus a 50% dilution of the mabs reduced the plaque counts to between 14 and 28 per cent. The mabs also showed activity in the ELISA. The titers were 10^4 - 2×10^5 for inactivated ascites fluid and eluats.

Test results made it possible to recommend two variants of challenge infections, the intradermal and the intraperitoneal application of defined virus doses, according to the situation. Mice with passively acquired immunity after

application of anti-vaccinia immune sera or anti-vaccinia mabs, i.e. only humoral immunity, survived intraperitoneal challenge infection with 4 LD_{50} . After the intradermal challenge, however, they were fully susceptible. Mice immunized with live vaccinia virus showed a solid immunity to both intradermal and intraperitoneal challenge.

7. Literaturverzeichnis:

ABEL P., 1962:

Topography in vaccinia genetics.

Virology 17, 347-348.

AMIES C.R., 1962:

Immunity to vaccinia induced by small doses of active virus.

J. Hyg. Cambr. 60, 483-493.

APPLEYARD G., A.J. HAPEL, E.A. BOULTER, 1971:

An antigenic difference between intracellular and extracellular rabbitpox virus.

J. gen. Virol. 13, 9-17.

APPLEYARD G., J.C.N. WESTWOOD, 1964:

A protective antigen from the poxviruses.

II Immunization of animals.

Brit. J. exp. Pathol. 45, 162-173.

BALACHANDRAN N., P. SETH, L.N. MOHAPATRA, 1979:

Use of the ⁵¹chromium release test to demonstrate antigenic differences between extracellular and intracellular forms of vaccinia virus.

J. gen. Virol. 45, 65-72.

BAXBY D., 1981:

Jenner's smallpox vaccine.

London, Heinemann Educational Books.

BAXBY D., R.M. GASKELL, C.J. GASKELL, H. BENNET, 1986:

Ecology of orthopoxviruses and use of recombinant vaccinia vaccines.

Lancet 8551, 850-851.

BOULTER E.A., 1969:

Protection against Poxviruses.

Proc. roy. Soc. Med. 62, 295-297.

BOULTER E.A., G. APPELYARD, 1973:

Differences between extracellular and intracellular forms of poxvirus and their implication.

Progr.Med.Virol. 16, 86-107.

BOULTER E.A., J.C.N. WESTWOOD, H.B. MABER, 1961:

Value of serotherapy in a virus disease (rabbit-pox).

Lancet 2 Nov 4, 1012-1015.

BOULTER E.A., H.T. ZWARTOUW, D.H.J. TITMUSS, H.B. MABER, 1971:

The nature of the immune state produced by inactivated vaccinia virus in rabbits.

Amer. J. Epidemiol. 94 No. 6, 612-620.

BRIODY B.A., 1959:

Response of mice to ectromelia and vaccinia viruses.

Bacteriol. Rev. Vol 23 No 2., 61-95.

BRODEUR B.R., A. TSANG, Y. LAROSESE, 1984:

Parameters affecting ascites tumor formation in mice and monoclonal antibody production.

J. Immun. Meth. 71, 265-272.

BULLER R.M.L., G.D. WALLACE, 1985:

Reexamination of the efficacy of vaccination against mousepox.

Lab. Anim. Sci. 35/5, 473-476.

BYRNE J.A., M. SOLOSKI, J.A. HOLOWCZAK, 1983:

Immune responses of DBA/2 mice bearing melanoma tumors: Cell-mediated immune responses after challenge with vaccinia virus.

Cancer Immunol. Immunother. 16, 81-87.

BÜTTNER M., 1984:

Spontane zellvermittelte Zytotoxizität.

Tierärztl. Umschau 39, 214-218.

CHERNOS V.I., N.N. VASILIEVA, T.P. ANTONOVA, V.V. SURGAY, 1975:

Study of the antigenic and immunogenic properties of neurovaccinia virus TS-mutants.

Arch. Virol. 47, 89-96.

CZERNY C.-P., 1986:

Zellkulturadaptierung des humanen Coronavirus OC-43 und dessen epizootiologische Bedeutung.

München, Vet. Med. Diss.

DIMMOCK N.J., 1984:

Mechanism of neutralisation of animal viruses.

J. gen. Virol. 65, 1015-1022.

DIXON L.W., D. BROWN, C.C. WAGNER, 1982:

Response of numerous strains of mice to the IHD-T strain of vaccinia virus.

Lab. Anim. Sci. 32/4, 419-.

DUNLAP R.C., L.F. BARKER, 1973:

Vaccinia virus strain differences.

Arch. ges. Virusforsch. 42, 107-116.

FAZEKAS DE ST.GROTH S., D. SCHEIDEGGER, 1980:

Production of monoclonal antibodies: Strategy and tactics.

J. Immun. Meth. 35, 1-2.

HARRIS W.J., J.C.W. WESTWOOD, 1964:

Phosphatungstate staining of vaccinia virus.

J. gen. Microbiol. 34, 491-495.

HERRLICH A., 1967:

Die Pocken.

Stuttgart, G. Thieme Verlag.

HOCHSTEIN-MINTZEL V., 1969:

Passive und adoptive Immunisierung der Säuglingsmaus gegen Poxvirus vaccinia und variolae: Ein Beitrag zur Wertigkeitsprüfung von Pockenimpfstoffen.

Z. Immun-Forsch. 138, -.

HOCHSTEIN-MINTZEL V., C. EPP, A. HERRLICH, 1967:

Erhöhte Resistenz der Säuglingsmaus gegen Vacciniavirus nach aktiver homologer Immunisierung.

Z. Immun-Forsch. 135, 246-254.

HOCHSTEIN-MINTZEL V., T. HÄNICHEN, H.C. HUBER, H. STICKL, 1975:

Vaccinia- und variolaprotektive Wirkung des modifizierten Vacciniastammes MVA bei intramuskulärer Immunisierung.

Zbl.Bakt.Hyg.Abt.I Orig.A 230, 283-297.

HUTT L.M., 1975a:

The immune response to infection with vaccinia virus in mice I. Infection and the production of antibody neutralizing cell-associated and cell-free virus.

J. Hyg. Camb. 74, 301-314.

HUTT L.M., 1975b:

The immune response to infection with vaccinia virus in mice: II. Appearance of hypersensitivity, production of macrophage-migration inhibitory factor and transformation of spleen cells in response to virus antigens.

J. Hyg. Camb. 74, 315-327.

HÜBERT P., 1985:

Charakterisierung von monoklonalen Antikörpern gegen Rotaviren und ihre Anwendung in der Diagnostik.

München, Vet. Med. Diss.

IKUTA K., H. MIYAMOTO, S. KATO, 1979:

Comparative studies on LS-antigens induced by vaccinia and cowpox viruses.

J. gen. Virol. 45, 755-759.

JACOBY R.O., P.N. BHATH, E.A. JOHNSON, F.X. PATURZO, 1983:

Pathogenesis of vaccinia (IHD-T) virus infection in Balb/c AnN mice.

Lab. Anim. Sci. 33 No. 5, 435-441.

KEMPE C.H., 1960:

Studies on smallpox and complications of smallpox vaccination.

Pediatrics 26, 176-189.

KEMPE C.H., C. BOWLES, G. MEIKLEJOHN, T.O. BERGE, L.S.

VINCENT, B.V. SUNDARA BABU, S. GOVINDARJAN, N.R.

RATHAKANNAN, A.W. DOWNIE, V.R. MURTHY, 1961:

The use of vaccina hyperimmune gamma-globulin in the prophylaxis of smallpox.

Bull. WHO 25, 41-48.

KERN R., 1987:

Versuche zur serologischen Charakterisierung von
Orthopockenviren mit Hilfe von monoklonalen
Antikörpern.

München, Vet.Med.Diss.

KITAMOTO N., E. GOTO, S. TANIMOTO, T. TANAKA, H. MIYAMOTO,
N. WAKAMIYA, K. IKUTA, S. UEDA, S. KATO, 1984:

Cross-reactivity between cowpox and vaccinia virus
with monoclonal antibodies.

Arch. Virol. 82, 129-136.

KITAMOTO N., S. TANIMOTO, K. HIROI, T. TANAKA, H. MIYAMOTO,
N. WAKAMIYA, S. UEDA, S. KATO, 1986a:

Cross-reactivity among cowpox, ectromelia and vaccinia
viruses with monoclonal antibodies recognizing
distinct antigenic determinants in A-type inclusion
bodies.

Arch. Virol. 91 , 357-366.

KITAMOTO N., S. TANIMOTO, K. HIROI, T. TANAKA, H. MIYAMOTO,
N. WAKAMIYA, K. IKUTA, S. UEDA, S. KATO, 1986b:

Polypeptide analysis with monoclonal antibodies of A-
type inclusion bodies induced by cowpox virus.

Arch. Virol. 89 , 15-28.

KÖHLER G., C. MILSTEIN, 1975:

Continuous cultures of fused cells secreting antibody
of predefined specificity.

Nature 256, 495-497.

LAFFERTY K.J., 1965:

The relationship between molecular charge and the
biological activity of antibody directed against
rabbitpox virus.

Virology 25, 591-602.

LANE J.M., F.L. RUBEN, J.M. HEFF, J.D. MILLAR, 1969:
Complication of smallpox vaccination.
N. Engl. J. Med. 281 No. 22, 1202-1208.

LEADING ARTICLE: ., 1970:
Antiserum against smallpox.
Brit. Med. J. 4, 385-386.

LINK F., D. BLASKOVIC, J. RAUS, P. ALBRECHT, 1965:
Investigations into the adaption of a neurovaccinia
virus to mouse lungs.
Acta virol. 9, 323-331.

MAHNEL H., 1960:
Tierexperimentelle Untersuchungen mit Vakzine-Antigen.
Arch. ges. Virusforsch. 10, 529-539.

MAHNEL H., 1985:
Schutzimpfung gegen Mäusepocken.
Tierärztl. Prax. 13 (3), 403-407.

MAHNEL H., E. MUNZ, 1965:
Diaplacentare und trophogene Übertragung der
Variolaimmunität bei der weißen Maus.
Zschr. Hyg. 150, 340-346.

MARENNIKOVA S., N.N. MALCEVA, N.A. HABAHPASEVA, 1981:
ELISA-a simple test for detecting and differentiating
antibodies to closely related orthopoxviruses.
Bull. WHO 59, 365-369.

MATTHEWS R.E.F., 1982:
Classification and nomenclature of viruses.
Intervirology 17, 1-.

MAYR A., 1957:

Ein Beitrag zum Problem der qualitativen
Differenzierung einzelner Vaccinevirusstämme.
Zbl. Bakt. Abt. I Orig. 171, 7-19.

MAYR A., P.A. BACHMANN, B. BIBRACK, G. WITTMANN, Eds. 1974:
Virologische Arbeitsmethoden Teil I und Teil II.
Jena, VEB, Gustav Fischer Verlag.

MAYR A., V. HOCHSTEIN-HINTZEL, H. STICKL, 1975:
Abstammung, Eigenschaften und Verwendung des
attenuierten Vaccinia-Stammes MVA.
Infection 3 (1), 6-14.

MAYR A., H. STICKL, H.K. MÜLLER, K. DAHNER, H. SINGER,
1978:
Der Pockenimpfstamm MVA: Marker, genetische Struktur,
Erfahrungen mit der parenteralen Schutzimpfung und
Verhalten in abwehrgeschwächten Organismen.
Zbl. Bakt. Hyg. Abt. I Orig. B167, 375-390.

MORISHIMA T., K. HAYASHI, 1978:
Local cell-mediated immunity in vaccinia meningitis of
mice.
Microbiol. Immunol. 22 No.1, 41-45.

MORRISON D.K., J.K. CARTER, R.W. MOYER, 1985:
Isolation and charakterisation of monoclonal
antibodies directed against two subunits of rabbit-
poxvirus associated DNAdirected RNA Polymerase.
J. of Virol. 55 No.3, 670-680.

MOSS B., 1974:
Reproduction of Poxviruses.
In: Comprehensive Virology 3, 405-474.

MOSS B., 1985:

Vaccinia virus expression vector: A new tool for immunologists.

Immunology Today 6 No.8, 243-245, Plenum Press, New York.

MUNZ E., M. REIMANN, W.D. ZSCHEKEL, 1976:

Aerosol-Impfung gegen Mäusepocken im Vergleich zu anderen Vakzinationsverfahren.

Zbl. Vet. Med. B 23, 431-446.

NAGINGTON J., R.W. HORNE, 1962:

Morphological studies of ORF and vaccinia viruses. Virology 16, 248-260.

NISHIMURA C., M. NOMURA, M. KITAOKA, M. KIMURA, 1968:

Complement requirement of the neutralizing antibody appearing after immunization with smallpox-vaccine. Jap. J. Microbiol. 12, 255-259.

PAYNE L.G., 1979:

Identification of the vaccinia hemagglutinin polypeptide from a cell system yielding large amounts of extracellular enveloped virus.

J. of Virol. 31 No.1, 147-155.

RODRIGUEZ J.F., R. JANECKO, M. ESTEBAN, 1985:

Isolation and charakterisation of neutralizing monoclonal antibodies to vaccinia virus.

J. of Virol. 56, 482-485.

ROLLE H., A. MAYR, 1978:

Mikrobiologie, Infektions- und Seuchenlehre. Stuttgart, Ferd. Enke Verlag.

SCHLEGEL R., M. WADE, 1983:

Neutralized vesicular stomatitis virus binds to host cells by a different 'receptor'.

Biochem. Biophys. Res. Comm. 114 No.2, 774-778.

SOEKAWA M., C. MORITA, R. MORIGUCHI, M. NAKAHURA, 1974:

Neurovirulenz des Vaccinia-Virus für Mäuse.

Zbl. Bakt. Hyg. Abt. I Orig A 226, 434-442.

STICKL H., 1965:

Die Übertragung der vaccinalen Gewebeeimmunität auf Gewebekulturen.

Zschr. Hyg. 151, 149-159.

STICKL H., V. HOCHSTEIN-MINTZEL, A. MAYR, H.C. HUBER, H.

SCHÄFER, A. HOLZNER, 1974:

MVA-Stufenimpfung gegen Pocken. Klinische Erprobung des attenuierten Pocken-Lebendimpfstoffes, Stamm MVA.

Dtsch. med. Wschr. 99, 2386-2392.

SVET-MOLDAVSKAYA I.A., G.R. MATSEVICH, 1969:

'Vaccinial disease' of white rats as a model for the determination of the immunity to vaccinia virus.

Acta virol. 13, 290-295.

TURNER A., D. BAXBY, 1979:

Structural polypeptides of orthopoxvirus: Their distribution in various members and location within the virion.

J. gen. Virol. 45, 537-545.

TURNER G.S., E.J. SQUIRES, 1971:

Inactivated smallpox vaccine: Immunogenicity of inactivated intracellular and extracellular vaccinia virus.

J. gen. Virol. 13, 19-25.

WESTWOOD J.C.H., H.T. ZWARTOUW, G. APPLEYARD, D.H.J.

TITHUSS, 1965:

Comparison of the soluble antigens and virus particles
of vaccinia virus.

J. gen. Microbiol. 38, 47-53.

WILTON S., J. GORDON, S. DALES, 1986:

Identification of antigenic determinants by polyclonal
and hybridoma antibodies during the course of
infection by vaccinia virus.

Virology 148, 84-96.

Herrn Prof. Dr. Dr. h. c. mult. A. Mayr danke ich herzlich für die Bereitstellung des Arbeitsplatzes.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. H. Mahnel für die Überlassung des Themas und den jederzeit gewährten Rat, sowie die hilfreiche Unterstützung beim Anfertigen der Arbeit.

Allen Mitarbeitern der Isolierabteilung, insbesondere Herrn Dr. P. Hübert, Herrn Dr. C. Czerny, Herrn Dr. W. Eichhorn und Herrn Dr. H. Meyer danke ich für das engagierte Interesse, das gute Arbeitsklima, die stets gewährte Unterstützung und gute Tips.

Lebenslauf

25.12.1959	geboren als Sohn des Landwirtes Otto Hornstein und seiner Frau Josefine, geb. Arnold in Ostrach
1966	Eintritt in die Volksschule Ostrach
1969	Wechsel auf das Hohenzollerngymnasium Sigmaringen
Mai 1978	Abitur am Hohenzollerngymnasium
1978 - 80	Ableistung des Wehrdienstes in Dornstadt
1980 - 82	Studium der Tiermedizin an der Freien Universität Berlin
1982 - 86	Studium der Tiermedizin an der Ludwig-Maximilians-Universität München
13.03.1986	Staatsexamen
April 1986	Beginn der vorliegenden Dissertation
09.04.1986	Approbation als Tierarzt

